

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Jana Vaclová

Charakterizace nových HILIC stacionárních fází
Characterization of new HILIC stationary phases

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Petr Kozlík, Ph.D.
Konzultant diplomové práce: doc. RNDr. Květa Kalíková, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 8. června 2020

Podpis

Abstrakt

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC) je často využívanou separační metodou pro analýzu polárních látek. Představuje alternativu k chromatografii na reverzních fázích, kde tyto látky vykazují nedostatečnou či žádnou retenci. V současné době je pro HILIC dostupná řada stacionárních fází a stále se vyvíjejí nové. Cílem této diplomové práce byla charakterizace a vzájemné porovnání stacionárních fází tří relativně nových HILIC kolon obsahujících jako stacionární fázi nemodifikovaný silikagel (HILIC-A), silikagel modifikovaný aminopropylovými skupinami (HILIC-B) a silikagel modifikovaný polyhydroxylovým řetězcem (HILIC-N). Na základě studia vlivu obsahu acetonitrilu v mobilní fázi na retenci modelové sady peptidů byl prokázán multimodální retenční mechanismus. Analýzou 18 modelových analytů s rozdílnými hodnotami pK_a bylo zjištěno, že složení vodné složky mobilní fáze (pufru), konkrétně její koncentrace a hodnota pH, má významný dopad na retenci ionizovaných analytů i peptidů na studovaných stacionárních fázích. Významný příspěvek iontových interakcí k retenci byl pozorován na kolonách HILIC-B a HILIC-A. Retence bazických látek na koloně HILIC-B stoupala se zvyšující se iontovou silou, naopak u kolony HILIC-A klesala. S rostoucím pH pufru mobilní fáze výrazně vzrostla retence disociovaných kyselin na koloně HILIC-B, naopak na koloně HILIC-A se výrazně zvýšila retence bazických, pozitivně nabitých látek. Retentivita studovaných kolon byla porovnána s 21 komerčně dostupnými kolonami používanými v HILIC. Dále byla optimalizována a porovnána analýza směsi peptidů na studovaných kolonách za použití isokratické a gradientové eluce s cílem zkrácení doby analýz.

Klíčová slova: HILIC, HILIC-A, HILIC-B, HILIC-N, koncentrace pufru, pH pufru, peptidy

Abstract

Hydrophilic interaction liquid chromatography is a frequently used separation method for analysis of polar compounds. It is an alternative method to reversed-phase chromatography, where these compounds show insufficient or very weak retention. A high number of stationary phases are currently available for HILIC and new ones are still being developed. The aim of this diploma thesis was to characterize and compare three relatively new HILIC columns containing an unmodified silica gel (HILIC-A), aminopropyl modified silica (HILIC-B) and polyhydroxyl chain modified silica (HILIC-N) as stationary phase. Based on the study of the effect of acetonitrile content in mobile phase on the retention of a model set of peptides, a multimodal retention mechanism was demonstrated. Analysis of 18 model analytes with different pK_a values showed, that the composition of aqueous part of mobile phase (buffer), more specifically its concentration and pH value, has a significant impact on retention of ionized analytes and peptides on the studied stationary phases. A significant contribution of ionic interactions to retention was observed on HILIC-B and HILIC-A columns. The retention of basic compounds on the HILIC-B column increased with increasing ionic strength, while it decreased on the HILIC-A column. Increasing the pH of the mobile phase buffer significantly increased the retention of dissociated acids on the HILIC-B column, while on the HILIC-A column significantly increased the retention of basic, positively charged compounds. The retentivity of studied columns was compared with 21 commercially available HILIC columns. Furthermore, the analysis of a mixture of peptides on the studied columns was optimized and compared using isocratic and gradient elution in order to shorten the analysis time.

Key words: HILIC, HILIC-A, HILIC-B, HILIC-N, buffer concentration, buffer pH, peptides

Poděkování

Chtěla bych velmi poděkovat svému školiteli RNDr. Petru Kozlíkovi, Ph.D., za odborné vedení mé diplomové práce, cenné rady, ochotu a trpělivost. Taktéž bych chtěla poděkovat konzultantce mé diplomové práce doc. RNDr. Květě Kalíkové, Ph.D., za vynikající rady a připomínky.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	8
1 ÚVOD.....	10
2 TEORETICKÝ ÚVOD.....	11
2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	11
2.2 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie	12
2.2.1 Historie.....	12
2.2.2 Retenční mechanismus.....	13
2.2.3 Stacionární fáze.....	14
2.2.3.1 Nemodifikované silikagelové stacionární fáze	16
2.2.3.2 Aminové stacionární fáze.....	17
2.2.4 Mobilní fáze	18
2.3 Charakterizace separačních systémů.....	19
2.4 Separace peptidů v HILIC.....	20
2.4.1 Analyzované peptidy.....	21
2.4.1.1 Pentapeptidy.....	21
2.4.1.2 Nonapeptidy	22
2.4.1.3 Angiotensiny	23
2.5 Aplikace HILIC.....	24
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	26
3.1 Instrumentální vybavení a spotřební materiál	26
3.2 Použité chemikálie	27
3.3 Příprava vzorků	28
3.4 Použité mobilní fáze.....	28
3.5 Separační podmínky.....	29
3.6 Výpočet chromatografických parametrů.....	30
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	31
4.1 Vliv složení mobilní fáze na retenci peptidů.....	31
4.2 Vliv koncentrace pufru mobilní fáze na retenci.....	35
4.2.1 Vliv koncentrace pufru mobilní fáze na retenci bazických analytů	35
4.2.2 Vliv koncentrace pufru mobilní fáze na retenci kyselých analytů	36

4.2.3	Vliv koncentrace pufru mobilní fáze na retenci neutrálních analytů	38
4.3	Vliv pH mobilní fáze na retenci	39
4.3.1	Vliv pH pufru mobilní fáze na retenci bazických analytů	39
4.3.2	Vliv pH pufru mobilní fáze na retenci kyselých analytů	40
4.3.3	Vliv pH pufru mobilní fáze na retenci neutrálních analytů.....	42
4.4	Retentivita kolon	43
4.5	Vliv koncentrace a pH pufru mobilní fáze na retenci peptidů	45
4.5.1	Vliv koncentrace pufru mobilní fáze na retenci peptidů	45
4.5.2	Vliv pH pufru mobilní fáze na retenci peptidů	48
4.6	Separace peptidů na studovaných kolonách	51
5	ZÁVĚR.....	57
6	CITOVANÁ LITERATURA	59

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ACE	angiotensin-konvertující enzym
ACN	acetonitril
A_s	oblasti obsazené molekulami rozpouštědla
BTMA	benzyltrimethylamonium chlorid
c	molární koncentrace [mol/l]
C8	oktylová skupina
C18	oktadecylová skupina
DAD	detektor s diodovým polem (z angl. <i>Diode-array detector</i>)
f	šířka píku vzestupné části [min]
FD	fluorescenční detekce (z angl. <i>Fluorescent detection</i>)
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (z angl. <i>Hydrophilic interaction liquid chromatography</i>)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. <i>High performance liquid chromatography</i>)
IR	infračervená spektroskopie (z angl. <i>Infrared spectroscopy</i>)
k	kapacitní poměr
k_w	hypotetický kapacitní poměr v čistě vodné mobilní fázi
ESI-MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (z angl. <i>Electrospray ionization mass spectrometry</i>)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (z angl. <i>Tandem mass spectrometry</i>)
m/z	poměr hmotnosti iontu k jeho náboji
NMR	nukleární magnetická rezonance (z angl. <i>Nuclear magnetic resonance</i>)
NPLC	kapalinová chromatografie na normálních fázích (z angl. <i>Normal-phase liquid chromatography</i>)
n_w	molekuly vodné složky na povrchu stacionární fáze
N_w	molární frakce vodné složky v mobilní fázi
P	rozdělovací koeficient oktanol-voda
pK_a	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
RPLC	kapalinová chromatografie na reverzních fázích (z angl. <i>Reversed-phase liquid chromatography</i>)

R^2	koeficient determinace
R_s	rozlišení
SCX	silná katexová chromatografie (z angl. <i>Strong cation-exchange chromatography</i>)
T_f	faktor chvostování
t_M	mrtvý čas [min]
t	retenční čas [min]
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. <i>Ultra high performance liquid chromatography</i>)
UV/VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra
v/v	objemový poměr
w	šířka píku při základně [min]
$w_{0,05}$	šířka píku v 5 % výšky [min]

1 ÚVOD

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC) je oblíbenou a hojně využívanou separační metodou pro analýzu polárních, biologicky aktivních látek. Je alternativou k chromatografii na reverzních fázích, kde tyto látky nevykazují dostatečnou retenci a k chromatografii na normálních fázích, kde je problém s jejich rozpustností v mobilní fázi. Ačkoliv je HILIC poměrně hojně používanou separační metodu, princip retenčního mechanismu je poměrně složitý a do této doby ne zcela objasněný. K retenci přispívají různé typy interakcí v závislosti na vlastnostech stacionární fáze, mobilní fáze a separovaných látek. Z těchto důvodů v HILIC neexistuje žádná „univerzální“ stacionární fáze první volby, jako je tomu například C18 u chromatografie na reverzních fázích. Proto výrobci chromatografických kolon přicházejí na trh se stále novými stacionárními fázemi vhodnými pro HILIC.

Cílem této diplomové práce byla charakterizace a vzájemné porovnání tří relativně nových stacionárních fází od firmy Advanced Chromatography Technologies. Jednalo se o stacionární fáze na základě nemoifikovaného silikagelu, silikagelu modifikovaného aminopropylovými skupinami a silikagelu modifikovaného polyhydroxylovým řetězcem. Byl studován vliv obsahu acetonitrilu v mobilní fázi a vliv koncentrace a pH pufru mobilní fáze na retenci biologicky aktivních peptidů a modelové sady 18 analytů. Retentivita studovaných kolon byla porovnána s retentivitou 21 komerčně dostupných kolon využívaných v HILIC. V posledním kroku byla optimalizována a porovnána analýza směsi peptidů za podmínek isokratické a gradientové eluce.

2 TEORETICKÝ ÚVOD

2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) představuje jednu z nejčastěji používaných separačních metod. Díky velkému množství kombinací mobilních a stacionárních fází ji lze využít pro separaci širokého spektra látek. Vzhledem k zvyšujícím se požadavkům na zkrácení doby analýzy byla na trh v roce 2004 uvedena tzv. ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) umožňující účinnější a rychlejší analýzy. V UHPLC se používají kolony obsahující částice menší než 2 μm a separace pak probíhají za vyšších tlaků [1].

V HPLC se v současné době využívá několik separačních módů. Kapalinová chromatografie, kde je používaná stacionární fáze nepolární a mobilní fáze naopak polární, je označována jako kapalinová chromatografie na reverzních fázích (RPLC). Stacionární fázi je obvykle silikagel modifikovaný alkylovými skupinami jako jsou např. oktylové (C8) nebo oktadecylové (C18) skupiny. Mobilní fázi bývá směs jednoho či více organických rozpouštědel (převážně acetonitrilu nebo methanolu) s vodou nebo vodným pufrům. RPLC se používá především pro separaci nepolárních a lipofilních látek, jejichž retence se zpravidla snižuje s jejich vzrůstající polaritou a vzrůstajícím obsahem organického rozpouštědla v mobilní fázi [2]. Další možností je kapalinová chromatografie na normálních fázích (NPLC), kde se naopak používá stacionární fáze, která je polárnější než fáze mobilní. Stacionární fázi bývá převážně silikagel modifikovaný polárními skupinami nebo nemodifikovaný silikagel, mobilní fázi bývá například chloroform nebo hexan v kombinaci s alkoholy. NPLC se používá zejména pro separaci polárních látek, u nichž se retence zvyšuje s jejich vzrůstající polaritou a polaritou stacionární fáze a s klesající polaritou mobilní fáze. Nepolární látky mají naopak retenci velmi malou, nebo žádnou [3].

Slabě nebo středně polární látky mohou být separovány pomocí RPLC nebo NPLC, obvykle s opačným elučním pořadím. Velmi hydrofilní látky, jako jsou např. sacharidy či malé silně polární sloučeniny, mají v RPLC příliš nízkou retenci. V NPLC mají tyto látky naopak retenci příliš vysokou, nebo jsou špatně rozpustné v nepolárních či slabě polárních organických rozpouštědlech. Jejich separaci lze často zlepšit přidáním vody do mobilní fáze, která se imobilizuje na povrchu stacionární fáze. Pro tento

separační mód zavedl Alpert název hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC) [2, 4].

2.2 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

V HILIC se stejně jako v NPLC používají polární stacionární fáze, jako je nemodifikovaný silikagel, silikagel modifikovaný polárními skupinami (např. diol, kyano nebo amino skupinami) nebo polárními molekulami (např. cyklodextrin). Mobilní fáze jsou naopak složením podobné mobilním fázím používaným v RPLC. Mobilní fáze v HILIC obvykle tvoří z 60–95 obj. % organické rozpouštědlo (nejčastěji acetonitril) a vodná složka, kterou je buď voda nebo pufr [4]. Vodná složka musí tvořit minimálně 2,5 obj. % mobilní fáze pro dosažení dostatečné hydratace povrchu stacionární fáze. Vyšší eluční sílu má v tomto uspořádání vodná složka mobilní fáze [5].

V posledních letech se hydrofilní interakční kapalinová chromatografie stala hojně využívanou chromatografickou metodou pro analýzu široké škály látek, jako jsou toxiny, aminokyseliny, peptidy, farmaceutická léčiva atd. Obecně pro analýzu hydrofilních, polárních či nabitých látek. Důvodem její vzrůstající popularity je nejen schopnost separovat látky, které mají v RPLC nízkou či žádnou retenci, ale na rozdíl od NPLC nedochází k problémům s rozpustností polárních látek v nepolárních mobilních fázích a spojení s hmotnostní detekcí je, vzhledem k vysokému obsahu organického rozpouštědla v mobilní fázi, bezproblémové [6].

2.2.1 Historie

Přestože byl Alpert prvním, kdo použil pojem hydrofilní interakční kapalinová chromatografie, již v roce 1975 Linden a Lawhead separovali směs sacharidů a oligosacharidů za použití kolony Bondapak, obsahující jako stacionární fázi silikagel modifikovaný aminoskupinami. Jako mobilní fázi použili směs acetonitrilu s vodou v různém objemovém zastoupení, přičemž pozorovali, že s rostoucím obsahem acetonitrilu v mobilní fázi dochází ke zvyšování retence sacharidů [7]. V roce 1990 byl pak termín HILIC použit Alpertem, který ve své práci použil k separaci aminokyselin hydrofilní polymerní stacionární fázi a mobilní fázi tvořenou acetonitrilem a triethylamonium fosforečnanovým pufrem. Eluční pořadí takto separovaných

aminokyselin bylo opačné oproti jejich elučnímu pořadí v RPLC [8].

2.2.2 Retenční mechanismus

Přestože je hydrofilní interakční kapalinová chromatografie hojně využívanou analytickou metodou, její retenční mechanismus není doposud plně objasněn [6]. Nejprve byl retenční mechanismus HILIC vysvětlován pomocí retenčního mechanismu NPLC. Předpokládalo se, že dochází k interakci hydroxylových skupin polárních látek s polárními skupinami na povrchu stacionární fáze. Tedy že dochází k jejich adsorpci na povrchu stacionární fáze. Tato teorie byla však vhodná pouze pro analyty obsahující ve své struktuře hydroxylové skupiny a nenašla proto širší uplatnění [9].

Naopak komplexnější retenční mechanismus HILIC, navržený Alpertem v jeho práci z roku 1990, je dodnes uznávaný. Jeho princip je založen na rozdělování polárních analytů mezi dvě kapalně fáze – „hydrofobní“ část mobilní fáze a hydrofilní vodnou vrstvu, která je sorbována na povrchu polární stacionární fáze [8]. Na polárních funkčních skupinách stacionární fáze dochází k přednostní adsorpci vody a vzniku difúzní vrstvy s gradientem vody z adsorpčního povrchu stacionární fáze do mobilní fáze [10]. Adsorpce vody je tím vyšší, čím nižší je její obsah v mobilní fázi, přičemž minimální obsah vodné složky mobilní fáze musí činit 2,5 obj. % [11]. Retence polárních analytů je tedy tím vyšší, čím vyšší je jejich polarita [8].

Hemström a Irgum ve své práci odvodili, že při vzrůstajícím množství vodné složky mobilní fáze narůstá její podobnost s vodnou vrstvou sorbovanou na povrchu stacionární fáze, což způsobí zvýšení rozpustnosti polárních látek v mobilní fázi a jejich nižší retenci. Retence látek je tedy přímo úměrná jejich polaritě, polaritě stacionární fáze a nepřímo úměrná polaritě mobilní fáze, jejíž polarita roste s obsahem vodné složky [12].

Rozdělování není v HILIC jediným mechanismem přispívajícím k separaci a retenci analytů. V závislosti na separačních podmínkách se na retenci mohou podílet také slabé ne vazebné interakce jako jsou vodíkové interakce, dipól-dipól interakce a elektrostatické interakce [13, 14]. Rozsah, v němž se každý mechanismus uplatňuje, závisí na typu použité stacionární fáze, organického rozpouštědla a vodné složky mobilní fáze včetně typu separovaných látek [10].

Retenční mechanismus v HILIC je dosud diskutovaným tématem, nicméně z dosavadních výzkumů je považován za komplexní. Předpokládá se, že se na retenci

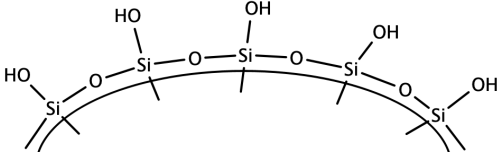
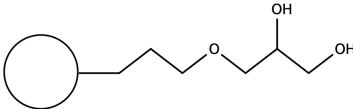
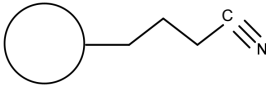
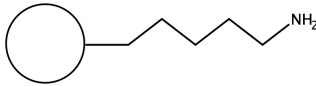
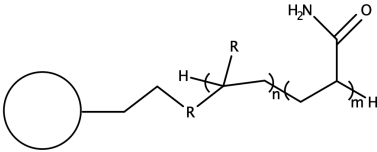
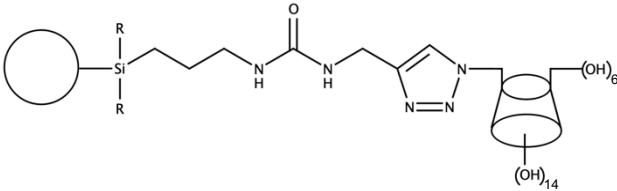
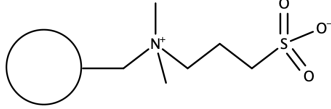
polárních látek podílí jak rozdělování analytu mezi mobilní fázi a vrstvu vodné fáze imobilizované na povrch stacionární fáze, tak adsorpce na povrchu stacionární fáze [12].

2.2.3 Stacionární fáze

Pro separace v hydrofilní interakční kapalinové chromatografii lze obecně použít jakoukoli kolonu obsahující polární stacionární fázi se schopností adsorpce vodné vrstvy na svém povrchu [6]. Nejčastěji používanou stacionární fází je nemodifikovaný silikagel, nebo silikagel s chemicky vázanými polárními skupinami jako jsou kyanové skupiny, diolové, aminoskupiny atd., nebo celými molekulami, např. cyklodextrinem nebo polyethylenglykolem. Lze také použít polární kolony obsahující iontové či neiontové polární skupiny navázané na povrchu silikagelu či organické polymerní matici [4]. V Tab 2.1 jsou uvedeny příklady stacionárních fází používaných v HILIC a jejich struktury [10]. Jednotlivé druhy stacionárních fází jsou důkladně popsány v přehledném článku od Jandery [4].

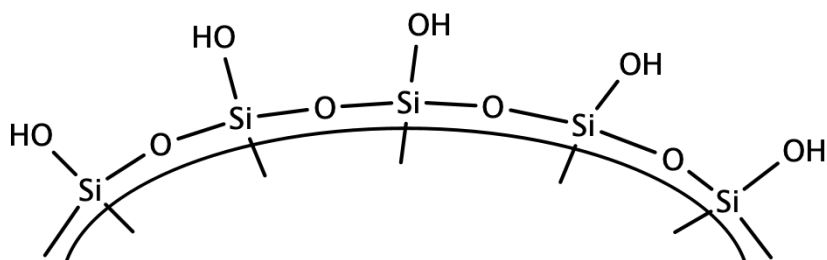
Kolony ACE HILIC, jejichž retenčnímu mechanismu se věnuje experimentální část této práce, obsahují rozdílné stacionární fáze. Kolona HILIC-A obsahuje stacionární fázi z nemodifikovaného silikagelu, stacionární fáze kolony HILIC-B je tvořena silikagelem modifikovaným aminopropylovou skupinou. Tyto dvě stacionární fáze budou podrobněji popsány v následujících samostatných kapitolách. Kolona HILIC-N obsahuje jako stacionární fázi silikagel modifikovaný polyhydroxylovým řetězcem, který není výrobcem blíže specifikován.

Tab 2.1 Příklady stacionárních fází a jejich struktur používaných v HILIC [10].

Stacionární fáze	Struktura stacionární fáze
Nemodifikovaný silikagel	
Silikagel modifikovaný diolovými skupinami	
Silikagel modifikovaný kyanoskupinami	
Silikagel modifikovaný aminoskupinami	
Silikagel modifikovaný amidovými skupinami	
β-cyklodextrinová stacionární fáze	
Zwitterionická stacionární fáze sulfoalkylbetain (ZIC-HILIC)	

2.2.3.1 Nemodifikované silikagelové stacionární fáze

Stacionární fáze z nemodifikovaného silikagelu je v HILIC často využívanou stacionární fází. Mnoho výrobců vyvinulo kolony s touto stacionární fází speciálně pro HILIC [15]. V závislosti na technologii přípravy se však mohou komerčně dostupné stacionární fáze z nemodifikovaného silikagelu lišit v čistotě, což může způsobit, že kolony budou poskytovat odlišnou retenci, účinnost a tvary píků [4]. Na Obr 2.1 je znázorněna struktura nemodifikovaného silikagelu [10], tedy stacionární fáze kolony HILIC-A.



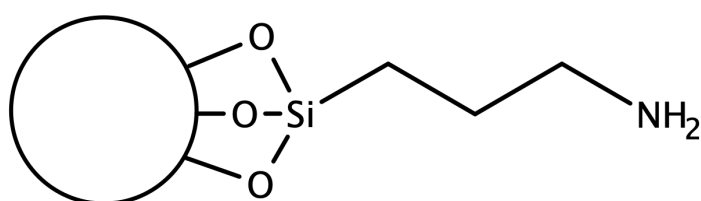
Obr 2.1 Struktura stacionární fáze kolony HILIC-A.

U kolon s nemodifikovaným silikagelem se na retenčním mechanismu mohou podílet iontově výměnné interakce, rozdělování a adsorpce v závislosti na složení mobilní fáze, vlastnostech silikagelu a separovaných látkách [16]. Použitím pufru o vyšším pH dochází k ionizaci povrchových silanolových skupin a iontově výměnné interakce se stávají podstatným retenčním mechanismem, který se projeví při separaci nabitých látek. Retence pozitivně nabitých analytů se výrazně zvýší vlivem kationtově výměnných interakcí, a naopak u negativně nabitých analytů dojde ke snížení retence vlivem elektrostatické repulze [6].

Mezi výhody stacionárních fází z nemodifikovaného silikagelu patří jejich vyšší chemická stabilita oproti stacionárním fázím chemicky modifikovaným. Tato jejich vlastnost je přínosná především při spojení s hmotnostní detekcí, kdy nedochází ke kontaminaci hmotnostního spektra případně uvolněnými ligandy [17]. Nevýhodou může být pak ireverzibilní adsorpce pozitivně nabitých analytů [18], nereprodukovatelné výsledky [10] nebo snadné předávkování kolony [12].

2.2.3.2 Aminové stacionární fáze

Aminopropylová stacionární fáze byla první chemicky vázanou stacionární fází použitou v HILIC [7] a dodnes je hojně využívanou pro separace aminokyselin, peptidů, cukrů, nukleosidů, karboxylových kyselin a některých léčiv [4]. Aminové stacionární fáze od různých výrobců mohou poskytovat rozdíly v retenci a selektivitě [19]. Struktura aminopropylové stacionární fáze obsažené v koloně HILIC-B je zobrazena na Obr 2.2 [4].



Obr 2.2 Struktura stacionární fáze kolony HILIC-B.

Zatímco jsou nenabitě polární látky zadržovány na stacionárních fázích silikagelu modifikovaného aminoskupinami především prostřednictvím rozdělovacího mechanismu, při nízkých hodnotách pH vodné složky mobilní fáze vykazují zvýšenou retenci kyselých látek [6]. To je způsobeno kombinací rozdělovacího a iontové výměnného mechanismu, jehož příspěvek k retenci se zvýšením iontové síly mobilní fáze sníží [15].

Výhodou aminopropylových stacionárních fází je, že umožňují zvýšenou rychlost mutarotace anomerů a eliminují tak tvorbu dvojitých píků monosacharidových diastereomerů při separaci sacharidů [12]. Pozorovanými nevýhodami u různých kolon byl výskyt ireverzibilní adsorpce negativně nabitých analytů [19], dlouhá doba ekvibrace [20], omezená stabilita ve vodných eluentech vedoucí k uvolňování ligandů a zhoršení symetrie píků [12] a s tím související kontaminace hmotnostního spektra při spojení s hmotnostní detekcí [21].

2.2.4 Mobilní fáze

Jak již bylo uvedeno výše, mobilní fáze v HILIC obsahují vysoký podíl organického rozpouštědla a obvykle 5–40 obj. % vody nebo pufru. Nejčastěji používanými pufrů jsou mravenčan amonný a octan amonný, kvůli své dobré rozpustnosti v organicky bohatých mobilních fázích a kompatibilitě s hmotnostní detekcí [6]. Lze však také použít například hydrogenuhličitan amonný, chloristan sodný nebo triethylaminfosfát [22].

Organické rozpouštědlo má při separaci v HILIC významný vliv na retenci, eluční pořadí a tvar píků [6]. Eluční síla organických rozpouštědel je obecně zvyšována v pořadí rostoucí polaritě rozpouštědla a schopností podílet se na proton-donorových/proton-akceptorových interakcích v následujícím pořadí [10]:

methanol > ethanol > 2-propanol > tetrahydrofuran > acetonitril

Nejpoužívanějším organickým rozpouštědlem v HILIC je acetonitril, methanol je naopak používán jen velmi zřídka. Důvodem je podobnost methanolu s vodou, neboť obě tato rozpouštědla jsou protická a konkurují si v solvataci povrchu polární stacionární fáze a dochází mezi nimi ke vzniku silných vodíkových interakcí. To platí v menší míře i pro ostatní alkoholy. Naopak acetonitril nevykazuje proton-akceptorové interakce, poskytuje dostatečnou retenci separovaných látek a dobrou symetrii píků a je tedy i přes svou toxicitu nejvhodnější pro HILIC [4].

V HILIC lze pro separaci použít isokratickou i gradientovou eluci. Isokratická eluce probíhá s použitím vysokého obsahu organického rozpouštědla. Gradientová eluce začíná s vysokým obsahem organického rozpouštědla, jehož obsah je s časem postupně snižován (zvyšuje se obsah vodné složky) a nakonec proběhne navrácení do výchozího stavu [6, 23].

Dalším významným faktorem ovlivňujícím retenci v HILIC je koncentrace vodné složky mobilní fáze (pufru), která má vliv na elektrostatické interakce mezi stacionární fází a nabitými analyty. Zvyšováním koncentrace pufru konkurují ionty soli nabitým analytům, což způsobí snížení elektrostatických interakcí s povrchem stacionární fáze a změnu retence [24, 25]. Dále se předpokládá vliv koncentrace pufru na tloušťku vodné vrstvy imobilizované na povrchu stacionární fáze, kde vyšší koncentrace pufru

pravděpodobně zvětší objem vodné vrstvy na povrchu stacionární fáze, což vede k následnému zvýšení retence [15].

Vliv na retenci a selektivitu má také pH vodné složky mobilní fáze, neboť ovlivňuje náboj ionizovatelných funkčních skupin analytů i stacionární fáze. Slabé báze a kyseliny se mohou vyskytovat v disociované nebo nedisociované formě, přičemž jejich převládající formu při daném pH a s tím související náboj určují jednotlivé disociační konstanty (pK_a) ionizovatelných funkčních skupin [23, 26]. Analyty v disociované formě jsou více hydrofilní a vykazují vyšší retenci vzhledem k jejich nedisociované formě. V případě nabitých stacionárních fází pak k retenci nabitých látek přispívají mimo jiné elektrostatické interakce [25–27].

2.3 Charakterizace separačních systémů

Výběr vhodné stacionární fáze je velmi důležitým krokem před vlastní analýzou. Nejenže trh nabízí mnoho různých stacionárních fází, ale i stejné typy stacionárních fází mohou poskytovat odlišnou retenci, účinnost a tvary píků [4]. Podrobným popisem těchto stacionárních fází lze pak výběr vhodné kolony pro danou aplikaci usnadnit.

K charakterizaci chromatografických kolon existuje mnoho testů, a ačkoli většina z nich byla navržena pro RPLC, lze je aplikovat i pro HILIC [28]. Mezi základní charakteristiky patří určení fyzikálně-chemických vlastností stacionární fáze, jako je velikost a tvar částic stacionární fáze, velikost pórů, specifický povrch aj. [29].

Také spektroskopické metody přispívají k charakterizaci chromatografických kolon, a to především nukleární magnetická rezonance (NMR) a infračervená spektroskopie (IR). NMR poskytuje informace o typu ligandu chemicky vázaného na povrchu stacionární fáze, dále je schopna rozlišit různé typy silanolových skupin a poskytuje informace o způsobu navázání ligandu na povrchu stacionární fáze. IR spektroskopie pak poskytuje informace o silikagelovém povrchu a obsahu volných silanolových skupin [29].

Statistická vyhodnocení chromatografických dat jsou dalším ze způsobů charakterizace chromatografických kolon. Využívají se chemometrické metody jako je např. faktorová analýza nebo analýza hlavních komponent. Dále přispívají k charakterizaci chromatografických kolon termodynamická měření, jako např. Van't Hoffova závislost, na jejímž základě lze odhalit informace o chromatografické selektivitě

a retenci [30].

V poslední řadě chromatografické testovací metody, kam lze zařadit různé empirické testy a chromatografické modely. Mezi empirické testy patří např. Waltersův test, Engelhardův test nebo Tanakův test. Tyto testy mají společné to, že získaná chromatografická informace závisí na vybraných testovaných analytech, pomocí kterých lze popsat specifickou vlastnost kolony (např. silanolovou aktivitu) [29]. Empirické testy se používají především k vzájemnému porovnávání stacionárních fází [28].

Chromatografické modely jsou zaměřeny na komplexnějším a bližším popisu retenčního chování vybraných testovaných analytů. Pro určení převládajícího retenčního mechanismu se v HILIC využívá model navržený Snyderem-Soczewinskym [31] a model navržený Schoenmakersem [32]. K tomuto účelu byl navržen i model přímo pro HILIC, tzv. smíšený model [33]. Po objevení přímé souvislosti mezi retencí peptidů a jejich aminokyselinovým složením, byla vytvořena také řada modelů schopných predikce retence peptidů. Tyto modely jsou založeny na odvozování koeficientů pro jednotlivé aminokyseliny, vystihující jejich hydrofobní či hydrofilní vlastnosti. Způsoby vytváření modelů jsou různé, lze použít například lineární regresní analýzu či substituci aminokyselin na syntetickém peptidu [34].

2.4 Separace peptidů v HILIC

Separace peptidů byla mezi prvními aplikacemi hydrofilní interakční kapalinové chromatografie po separaci sacharidů. Alpert separoval směs peptidů na polymerní stacionární fázi [8], Zhu použil k separaci směsi peptidů čtyři kolony, z nichž jedna byla HILIC obsahující taktéž polymerní stacionární fázi, dvě ionexové kolony a jedna RPLC kolona [35]. Yoshidou byla použita stacionární fáze ze silikagelu modifikovaného amidovými skupinami [3] a Oylerem stacionární fáze z modifikovaného silikagelu amino skupinami [36].

V současné době je zájem o HILIC v oblasti proteomiky způsoben především pro její ortogonalitu s RPLC ve vícerozměrné chromatografii, neboť HILIC-RP poskytuje stejnou nebo lepší ortogonalitu ve srovnání se silně katexovou chromatografií SCX-RP. [22, 37]. Také bylo zjištěno, že HILIC umožňuje obohacování a cílenou analýzu posttranslačních modifikací, jako je glykosylace, N-acetylace a fosforylace [22].

2.4.1 Analyzované peptidy

2.4.1.1 Pentapeptidy

Endogenní opioidní peptidy jsou přirozeně se vyskytujícími ligandy pro opioidní receptory, dělí se do několika skupin [38]. Jednou z nich je skupina enkefalinů vykazující významnou biologickou funkci. Enkefaliny jsou pentapeptidy pocházející z prekurzorového proteinu proenkefalinu [39] a jsou složeny z následující sekvence aminokyselin: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu/Met [40]. Leucin enkefalin a methionin enkefalin byly prvními endogenními opioidními peptidy objevenými v roce 1975 Kosterlitzem a kol. v centrálním nervovém systému savců [41].

Enkefaliny se nacházejí v centrálním nervovém systému a gastrointestinálním traktu [40]. V lidském mozku se vážou na receptory, na které se váže také morfin, čímž snižují citlivost k bolesti [38]. Dále se také podílejí na řízení činnosti respiračních, kardiovaskulárních a gastrointestinálních funkcí a na regulaci neuroendokrinů [40].

Jakékoli narušení syntézy enkefalinů může způsobit vážné duševní choroby. Proto jsou enkefaliny v současné době intenzivně studovány v souvislosti s autismem, Alzheimerovou chorobou a Parkinsonovou chorobou [42].

K separaci enkefalinů byla využita například kapalinová chromatografie na obrácených fázích [42, 43], hydrofilní interakční kapalinová chromatografie [43] nebo kapilární zónová elektroforéza [39].

2.4.1.2 Nonapeptidy

Nonapeptidy jako vasopresin, oxytocin a další jim funkčně i strukturně blízké peptidy vykazují důležitou biologickou aktivitu nejenom v lidském organismu [44]. Vasopresin, známý také jako antidiuretický hormon, je produkován v hypotalamu a dále transportován do zadní hypofýzy [45]. Jeho fyziologickou úlohou v ledvinách je řízení zadržování vody a zvyšování jejího zpětného vstřebávání. Dále také zvyšuje krevní tlak, podporuje agresi a dominanci. Vasopresin se vyskytuje ve dvou formách, a to jako Arg-vasopresin a jeho syntetický derivát Lys-vasopresin, který vykazuje nižší antidiuretickou aktivitu. [44].

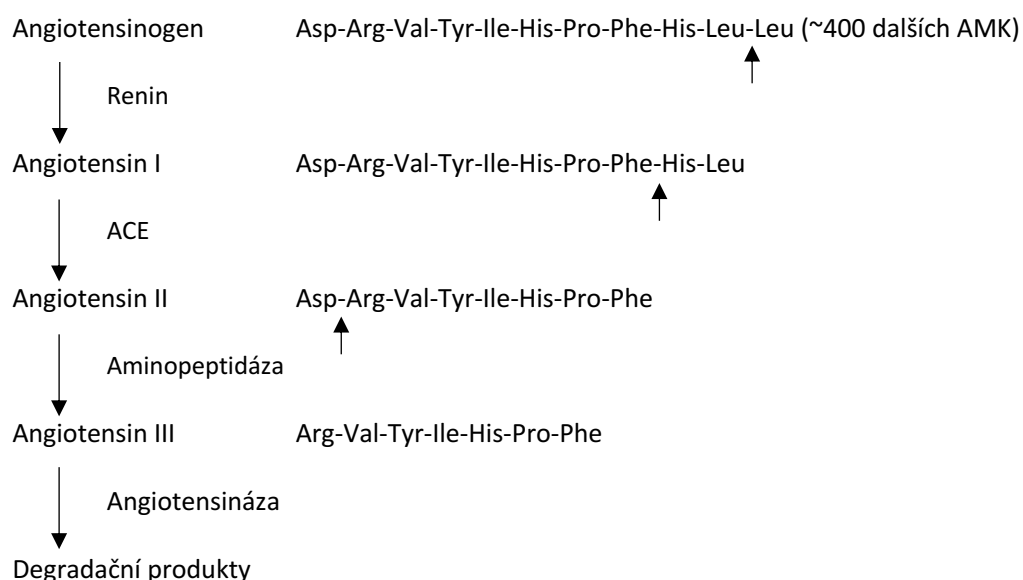
Oxytocin je cyklický nonapeptid a stejně jako vasopresin je produkován v hypotalamu a dále transportován do zadní hypofýzy. Oxytocin má vliv na sílu a frekvenci kontrakcí hladké svaloviny dělohy, čehož se využívá v porodnictví. Dále také podporuje ejekci mléka z mléčných žláz [46] a ovlivňuje sexuální a sociální chování u obou pohlaví [44].

Vasotocin se na rozdíl od vasopresinu, který se vyskytuje u savců, vyskytuje u ptáků, obojživelníků, ryb a plazů. Sekvence nonapeptidu Arg-vasotocinu se od Arg-vasopresinu liší pouze ve třetí aminokyselině, kde Arg-vasopresin má na této pozici fenylalanin a Arg-vasotocin isoleucin. Stejně jako vasopresin je vasotocin důležitým neurohormonem pro sociální chování produkován v hypotalamu. Ovlivňuje agresi, námluvy, párování a rodičovské chování [47].

K separaci nonapeptidů byla využita například kapalinová chromatografie na obrácených fázích [44], hydrofilní interakční kapalinová chromatografie [28] nebo kapilární elektroforéza [45].

2.4.1.3 Angiotensiny

Angiotensiny jsou peptidy pocházející z prekurzorového proteinu angiotensinogenu. Jsou součástí tzv. renin-angiotensinového systému, kde je prekurzorový protein angiotensinogen štěpen enzymem reninem za vzniku dekapeptidu angiotensinu I. Z angiotensinu I jsou dále, převážně v plicích, odštěpeny dvě aminokyseliny angiotensin-konvertujícím enzymem (ACE) za vzniku oktapeptidu angiotensinu II. Nakonec je angiotensin II štěpen aminopeptidázou na heptapeptid angiotensin III [48, 49]. Tento proces je znázorněn na Obr 2.3 [49].



Obr 2.3 Schéma vzniku angiotensinů z prekurzorového proteinu angiotensinogenu.

Systém renin-angiotensin se podílí na regulaci krevního tlaku a produkci aldosteronu. Primárním hormonem zapojeným do těchto procesů je angiotensin II. Angiotensin II má silné vasokonstriční účinky, inhibuje uvolňování reninu a stimuluje produkci aldosteronu a retenci sodíku. Angiotensin III je stejně silným stimulem produkce aldosteronu jako angiotensin II, v lidském těle je však ve čtyřikrát nižší koncentraci [49].

K separaci angiotensinů byla využita například hydrofilní interakční kapalinová chromatografie [43] nebo kapilární elektroforéza [50].

2.5 Aplikace HILIC

Zájem o hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii od roku 2003 výrazně vzrostl. HILIC je hojně využívanou analytickou separační metodou pro analýzu malých polárních molekul včetně nukleosidů, nukleotidů, aminokyselin, sacharidů, biomarkerů atd. [10], pro analýzu polárních nebo ionizovatelných sloučenin v oblasti farmaceutické chemie, metabolomiky, proteomiky, potravinářské chemie aj. [6]. Navíc ji lze snadno kombinovat s několika detekčními technikami jako je absorpce ultrafialového a viditelného záření (UV/VIS), fluorescence (FD), index lomu, hmotnostní spektrometrie (MS) aj. Ve spojení s hmotnostní detekcí lze navíc ve srovnání s RPLC vzhledem k vyšší těkavosti mobilní fáze používané v HILIC dosáhnout vyšší citlivosti [10]. V Tab 2.2 jsou uvedeny příklady aplikací separační metody HILIC.

Tab 2.2 Příklady aplikace HILIC.

Analyty	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Citace
β -blokátory a jejich deriváty v moči	Nemodifikovaný silikagel	ACN/10mM octan amonný, pH = 7,5, 85/15 (v/v) Isokratická eluce	UV	[51]
Efedrin	Silikagel modifikovaný amidovými skupinami	ACN/5mM mravenčan amonný, pH = 3,0, 88/22 (v/v) Isokratická eluce	MS/MS	[52]
Kotinin	Silikagel modifikovaný diolovými skupinami	ACN/100mM octan amonný, pH = 5,8, 95/5 (v/v) Isokratická eluce	DAD	[53]
Pyrimidiny a puriny	Silikagel modifikovaný aminoskupinami	ACN/25mM fosforečnan draselný, pH = 6,5, 80/20 (v/v) Isokratická eluce	UV	[19]
Cefalosporiny	β -cyklodextrinová stacionární fáze	A: 10mM mravenčan amonný, pH = 6,8 B: ACN/100mM mravenčan amonný, pH = 6,8, 90/10 (v/v) Gradientová eluce*	DAD	[54]
Melamin	Zwitterionická stacionární fáze sulfobetain (ZIC-HILIC)	ACN/25mM octan amonný, pH = 6,8, 85/15 (v/v) Isokratická eluce	UV	[55]
Pteriny v moči	Silikagel modifikovaný aminopropylovými skupinami	ACN/5mM fosforečnan draselný, pH = 6,0, 80/20 (v/v) Isokratická eluce	FD	[56]

(*) Gradientový program: 88–65 % B v průběhu 20 minut, 65 % B následujících 10 minut.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Instrumentální vybavení a spotřební materiál

- Kapalinový chromatograf řady UltiMate 3000 se spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem DAD-3000RS značky Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Ovládání přístroje i vyhodnocování naměřených dat bylo provedeno pomocí programu Chromeleon 7.
- Kapalinový chromatograf Agilent 1290 s trojitým kvadrupólovým hmotnostním detektorem Agilent 6460 značky Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Ovládání přístroje i vyhodnocování naměřených dat bylo provedeno pomocí programu Mass Hunter Workstation.
- Chromatografické kolony o rozměrech: 100 × 2,1 mm; velikost částic 1,7 μm byly získány od firmy ACE® (Aberdeen, Velká Británie):
ACE HILIC-N: stacionární fáze obsahující polyhydroxylový řetězec
ACE HILIC-A: stacionární fáze z nemodifikovaného silikagelu
ACE HILIC-B: stacionární fáze obsahující aminopropylové skupiny
- Analytické váhy Entris®, Sartorius (Göttingen, Německo)
- Ultrazvuková lázeň Elmasonic S 15 (H), Elma Schmidbauer GmbH (Singen, Německo)
- pH metr/konduktometr Jenway 3540, Jenway (Stone, UK), kalibrační pufrы Merck (Darmstadt, Německo)
- Zpracování výsledků bylo provedeno v programu Microsoft Excel 2015, Microsoft (Redmond, WA, USA) a Origin 2018b, OriginLab (Northampton, MA, USA)
- Vytvoření strukturních vzorců a výpočet hodnot pK_a a $\log P$ bylo provedeno pomocí programu MarvinSketch 20.6, ChemAxon (Budapešť, Maďarsko)

3.2 Použité chemikálie

- Standardy peptidů byly získány od firmy Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
[Lys⁸] vasopresin (Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-NH₂, čistota > 98 %)
[Arg⁸] vasotocin (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH₂, čistota > 97 %)
Leucin enkefalin amid (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-NH₂, čistota > 97 %)
Leucin enkefalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu, čistota > 95 %)
[Met⁵] enkefalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, čistota > 95 %)
Angiotensin II (H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH, čistota > 98 %)
Angiotensin I (H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-OH, čistota > 97 %)
- Analyty pro testování vlivu koncentrace a pH pufru mobilní fáze:
Pyridin (čistota > 99 %), anilin hydrochlorid (čistota > 99 %), kyselina sorbová (čistota > 99 %), kyselina acetylsalicylová (čistota > 99 %), methyl-4-hydroxybenzoát (čistota > 99 %), benzensulfonát sodný (čistota > 97 %), 2-fenylethylamin hydrochlorid (čistota > 98 %), kyselina 4-hydroxybenzoová (čistota > 99 %), N-benzylmethylamin (čistota > 97 %), nortriptylin hydrochlorid (čistota > 98 %), cytosin (čistota > 99 %), adenin (čistota > 99 %), kofein, benzyltrimethylamonium chlorid (čistota > 97 %) od firmy Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
Kyselina benzoová, chinolin od firmy Lachema n.p. (Brno, Česká republika)
Kyselina salicylová (čistota > 99,5 %) od firmy Ferak Berlin (Berlín, Německo)
Uracil (čistota > 99 %) od firmy Fluka Analytical (St. Gallen, Švýcarsko)
- Mravenčan amonný (čistota > 97 %), kyselina mravenčí (čistota > 99%), octan amonný (čistota > 98%), kyselina octová (čistota > 99%) od firmy Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA),
Acetonitril (čistota > 99,9 %), methanol (čistota > 99,9 %) od firmy Honeywell (Charlotte, NC, USA),
Toluen (čistota p.a.) od firmy Lachner (Neratovice, Česká republika)
- Deionizovaná voda byla upravena pomocí zařízení Milli-Q plus, Millipore (Bedford, MA, USA)

3.3 Příprava vzorků

Roztoky standardů peptidů byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml navážením 1 mg standardu a rozpuštěním v 1 ml mobilní fáze (ACN/50mmol/l mravenčan amonný, pH = 3,5, 80/20 (v/v)).

Pro porovnání separace peptidů na jednotlivých kolonách za použití gradientové a isokratické eluce byl připraven směsný roztok peptidů. Do mikrozkušavky bylo odpipetováno 35 μ l z jednotlivých roztoků standardů peptidů o koncentraci 1 mg/ml. Z takto připraveného směsného roztoku peptidů bylo dále odpipetováno 100 μ l, ze kterých bylo odpařeno rozpouštědlo. Nakonec bylo k získanému odparku napipetováno 50 μ l standardního roztoku [Arg⁸] vasotocinu, angiotensinu I a angiotensinu II o koncentracích 1 mg/ml. Tím byla získána směs peptidů, v které byly jednotlivé peptidy na vhodné koncentrační hladině k testování studovaných kolon.

Pro testování vlivu koncentrace a pH pufru mobilní fáze byly připraveny roztoky pevných analytů o koncentraci 1 mg/ml navážením 1 mg analytu a rozpuštěním v 1 ml mobilní fáze (ACN/50mmol/l mravenčan amonný, pH = 3,5, 83/17 (v/v)). Roztoky kapalných analytů (pyridin, chinolin, N-benzylmethylamin) byly připraveny o stejné koncentraci napipetováním 10 μ l analytu a 990 μ l výše uvedené mobilní fáze.

Pro určení mrtvého času kolon byl připraven roztok 10 μ l toluenu a 990 μ l acetonitrilu. Všechny roztoky byly připraveny na začátku práce a po celou dobu uchovávány v mrazáku.

3.4 Použité mobilní fáze

Všechna měření byla prováděna v mobilních fázích acetonitril/vodná složka. Jako vodná složka byl použit pufr mravenčanu amonného nebo octanu amonného. Pufry byly připravovány rozpuštěním příslušného množství dané soli v deionizované vodě a přidáním kyseliny mravenčí/octové nebo roztoku amoniaku pro dosažení požadované hodnoty pH. Roztoky pufrů byly vždy filtrovány přes nylonový filtr (0,45 μ m \times 47 mm).

3.5 Separační podmínky

Všechna měření byla prováděna v módu HILIC. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,5 ml/min. Dávkovaný objem byl 1 μ l. Teplota v karuselu byla 15 °C a kolony byly temperovány na 30 °C.

Při měření na kapalinovém chromatografu řady UltiMate 3000 s DAD detekcí byla použita isokratická eluce. Zvolené vlnové délky byly 220, 230, 250, 270 a 290 nm.

Směsný roztok peptidů byl kromě isokratické eluce změřen i pomocí gradientové eluce, pro kterou byl použit kapalinový chromatograf Agilent 1290 s trojitým kvadrupólovým hmotnostním detektorem. Z celkového hmotnostního spektra byly vyextrahovány poměry m/z charakteristických iontů jednotlivých peptidů, které jsou uvedeny v Tab 3.1. Gradientový program je uveden v Tab 3.2.

Tab 3.1 Poměry m/z charakteristických iontů analyzovaných peptidů.

Peptid	Hodnota poměru m/z
[Lys ⁸] vasopresin	1056,3
[Arg ⁸] vasotocin	1050,3
Leucin enkefalin amid	555,1
Leucin enkefalin	556,2
[Met ⁵] enkefalin	574,1
Angiotensin II	1046,4
Angiotensin I	1296,6

Tab 3.2 Gradientový program při měření směsi peptidů na testovaných kolonách za použití hmotnostního detektoru. Mobilní fáze: ACN/50mmol/l mravenčan amonný, pH = 3,5.

Čas [min]	ACN/pufr (v/v)
5	90/10
15	80/20
20	65/35
21	65/35
22	90/10
30	90/10

3.6 Výpočet chromatografických parametrů

V kapitole 4. Výsledky a diskuze, byly použity následující chromatografické parametry: kapacitní poměr (k), faktor chvostování (T_f) a rozlišení (R_s). K jejich výpočtu byly použity následující vzorce [5]:

Kapacitní poměr:

$$k = \frac{t - t_M}{t_M} \quad (3.1)$$

t retenční čas analytu [min]

t_M mrtvý čas [min]

Faktor chvostování:

$$T_f = \frac{w_{0,05}}{2f} \quad (3.2)$$

$w_{0,05}$ šířka píku v 5 % výšky [min]

f šířka píku vzestupné části [min]

Rozlišení:

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_2 + w_1} \quad (3.3)$$

t_1, t_2 retenční čas analytů [min]

w_1, w_2 šířky píku při základně [min]

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Vliv složení mobilní fáze na retenci peptidů

K testování vlivu složení mobilní fáze, tedy poměru organické složky a pufru, byl použit acetonitril a 50mmol/l mravenčan amonný o pH = 3,5. Testováno bylo sedm poměrů, konkrétně 76:24; 78:22; 80:20; 83:17; 86:14; 89:11 a 92:8 (ACN/mravenčan amonný (v/v)), na každé koloně.

K určení převládajícího retenčního mechanismu byly použity empirické rovnice navržené Schoenmakersem a kol. [32] (rovnice (4.1)) a Snyder-Soczewinskim [31] (rovnice (4.2)) popisující, zda se na retenčním mechanismu podílí rozdělování a/nebo adsorpce.

$$\log k = \log k_w - \frac{A_s}{n_w} \log N_w \quad (4.1)$$

k_w hypotetický kapacitní poměr v čistě vodné mobilní fázi

A_s oblasti obsazené molekulami rozpouštědla

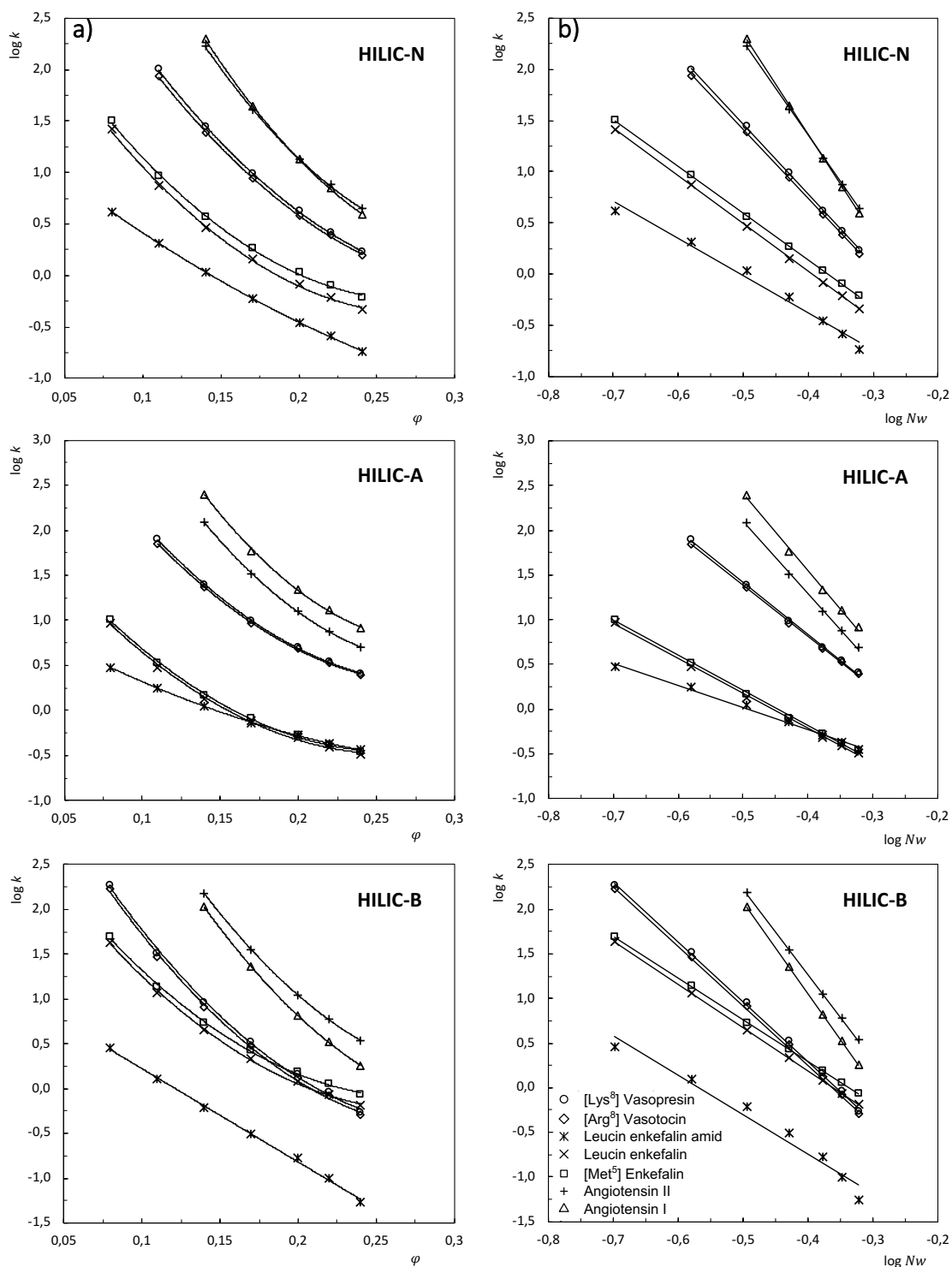
n_w molekuly vodné složky na povrchu stacionární fáze

N_w molární frakce vodné složky v mobilní fázi

$$\log k = A\varphi^2 + B\varphi + C \quad (4.2)$$

φ objemová frakce vodné části mobilní fáze

Na Obr. 4.1 a) je znázorněno vynesení logaritmu kapacitního poměru peptidů proti objemové frakci vodné složky mobilní fáze. Na Obr. 4.1 b) je pak znázorněna závislost logaritmu kapacitního poměru peptidu proti logaritmu molární frakce vodné složky v mobilní fázi. Z těchto grafů byly získány hodnoty koeficientů determinace, které jsou uvedeny v Tab 4.1.



Obr 4.1 Grafy závislosti logaritmu kapacitního poměru standardů peptidů na a) objemové frakci vodné složky mobilní fáze (φ), b) logaritmu molární frakce vodné složky mobilní fáze ($\log N_w$). Mobilní fáze: ACN/50mM mravenčan amonný, pH = 3,5.

Tab 4.1: Hodnoty koeficientů determinace (R^2) získaných z rovnic (4.1), (4.2) a (4.3) pro testované kolony, 1 - [Lys⁸] vasopresin, 2 - [Arg⁸] vasotocin, 3 - leucin enkefalin amid, 4 - leucin enkefalin, 5 - [Met⁵] enkefalin, 6 - angiotensin II, 7 - angiotensin I.

ST	HILIC-N			HILIC-A			HILIC-B		
	R^2 (4.1)	R^2 (4.2)	R^2 (4.3)	R^2 (4.1)	R^2 (4.2)	R^2 (4.3)	R^2 (4.1)	R^2 (4.2)	R^2 (4.3)
1	0,9998	0,9998	0,9999	0,9990	0,9997	0,9998	0,9994	0,9984	0,9998
2	0,9998	0,9998	0,9999	0,9991	0,9997	0,9998	0,9995	0,9982	0,9999
3	0,9863	0,9999	0,9999	0,9939	0,9999	0,9994	0,9673	0,9983	0,9983
4	0,9999	0,9989	0,9999	0,9981	0,9981	0,9999	1,0000	0,9988	0,9999
5	0,9999	0,9989	0,9999	0,9984	0,9988	0,9999	0,9999	0,9987	0,9999
6	0,9997	0,9998	0,9999	0,9979	0,9998	0,9999	0,9998	0,9999	0,9999
7	0,9999	0,9999	0,9999	0,9972	0,9994	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999

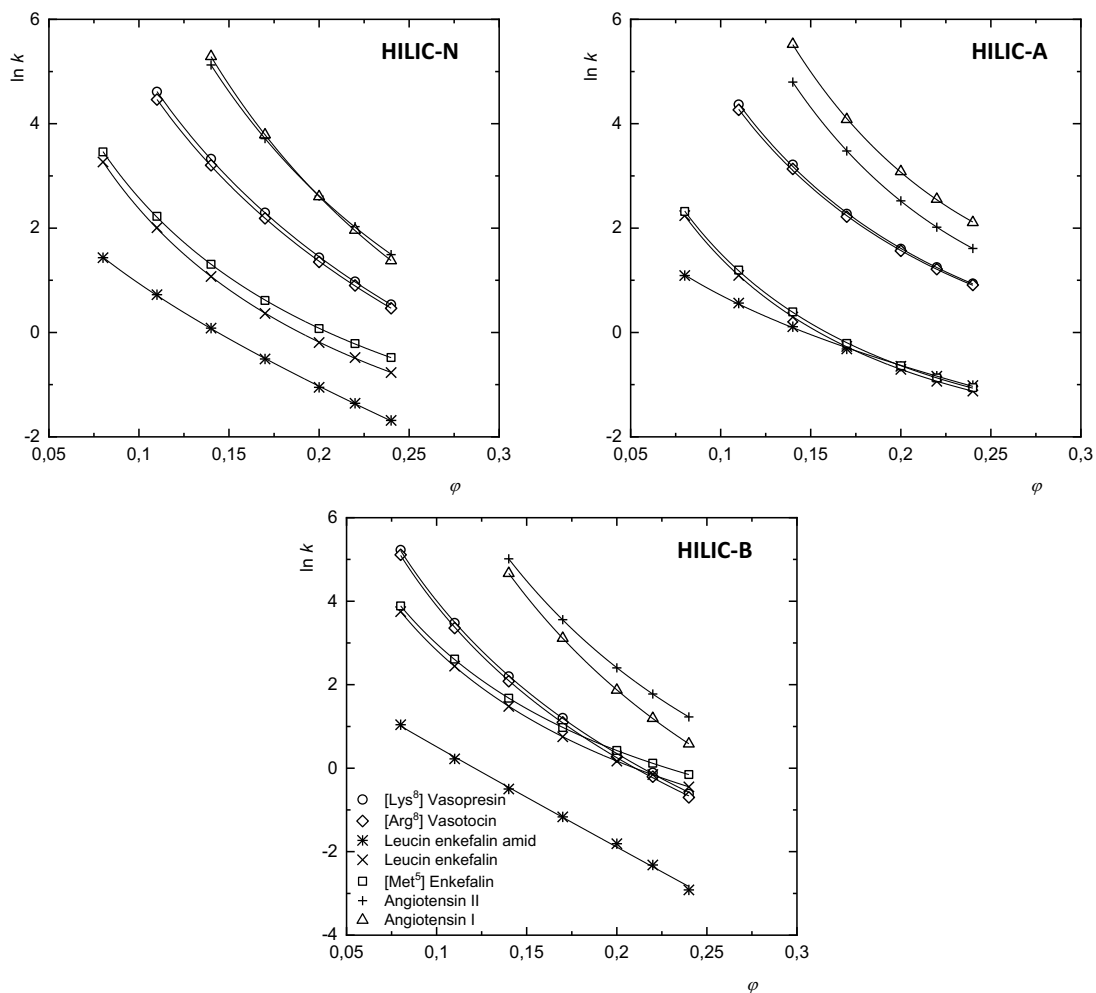
Z Tab 4.1 můžeme vidět, že pro rovnici (4.1) se hodnoty koeficientů determinace pohybují v rozmezí 0,9863 – 0,9999 pro kolonu HILIC-N, 0,9939 – 0,9991 pro kolonu HILIC-A a 0,9673 – 1 pro kolonu HILIC-B. Pro rovnici (4.2) je to 0,9989 – 0,9999 pro kolonu HILIC-N, 0,9981 – 0,9999 pro kolonu HILIC-A a 0,9982 – 0,9999 pro kolonu HILIC-B. Na základě těchto dat můžeme tedy soudit, že se na retenčním mechanismu peptidů podílí jak rozdělování, tak i adsorpce.

Následně byl pro porovnání s lineárním modelem, původně navrženým pro NPLC (rovnice (4.1)) a kvadratickým modelem, původně navrženým pro RPLC (rovnice (4.2)), použit smíšený model, navržený přímo pro metodu HILIC, který zahrnuje jak adsorpci, tak rozdělování [33]:

$$\ln k = A + B \ln \varphi + C \varphi \quad (4.3)$$

Obr. 4.2 znázorňuje závislost přirozeného logaritmu kapacitního poměru peptidů proti objemové frakci vodné složky mobilní fáze. Z těchto grafů byly získány hodnoty koeficientů determinace uvedené taktéž v Tab 4.1. Porovnáním hodnot z Tab 4.1 pak můžeme vidět, že hodnoty koeficientů determinace pro rovnici (4.3) jsou kromě koeficientu determinace pro Leucin Enkefalin amid na koloně HILIC-B ($R^2 = 0,9983$) vždy vyšší než 0,999. Smíšený model tedy potvrdil závěr získaný z předchozích modelů

a to ten, že retence studovaných peptidů v režimu HILIC je řízena jak rozdělováním, tak i adsorpcí.



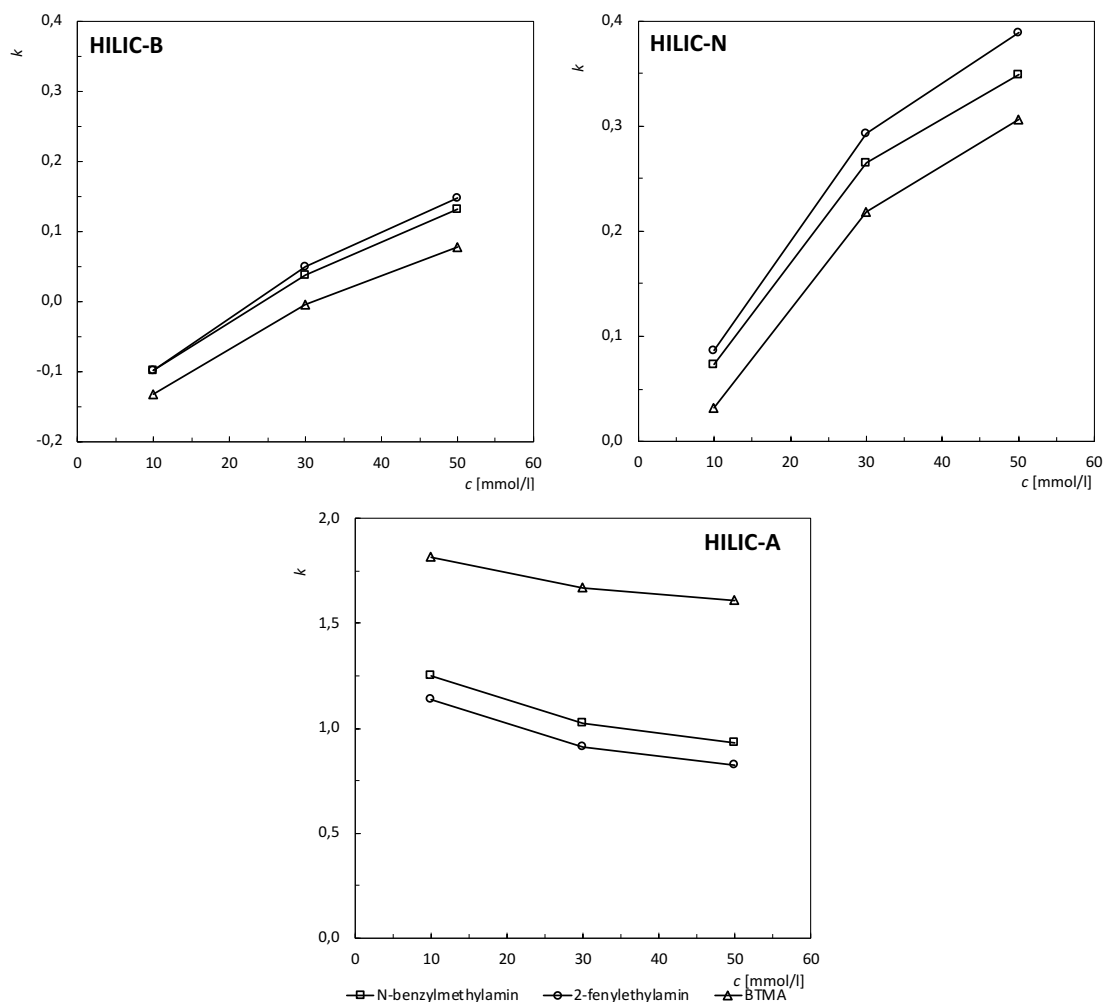
Obr 4.2 Grafy závislosti přirozeného logaritmu kapacitního poměru standardů peptidů na objemové frakci vodné části mobilní fáze (φ). Mobilní fáze: ACN/50mM mravenčan amonný, pH = 3,5.

4.2 Vliv koncentrace pufru mobilní fáze na retenci

Vliv koncentrace pufru (mravenčan amonný, pH = 3,5) na retenci vybraných analytů byl sledován v rozmezí 10, 30 a 50 mmol/l. Studované analyty byly vybrány na základě jejich polarity a rozdílných hodnot pK_a (jejich struktury, hodnoty pK_a a $\log P$ jsou uvedeny v příloze A). Všechna měření byla prováděna za použití isokratické eluce při složení mobilní fáze ACN/mravenčan amonný, pH = 3,5, 83:17 (v/v).

4.2.1 Vliv koncentrace pufru mobilní fáze na retenci bazických analytů

Z Obr 4.3 je vidět, že retence pozitivně nabitých analytů na koloně HILIC-B roste se zvyšující se koncentrací pufru (pro přehlednost jsou zobrazeny 3 vybrané analyty, kapacitní poměry ostatních analytů jsou uvedeny v příloze B). Tento jev souvisí s elektrostatickou repulzí pozitivně nabitých analytů s pozitivně nabitým povrchem stacionární fáze. Při vyšší koncentraci pufru jsou repulzní síly slabší, a naopak při jeho nižší koncentraci silnější, kde dokonce docházelo k tak silné elektrostatické repulzi, že některé analyty eluovaly před markerem mrtvého času. Obecně byla však retence studovaných analytů na koloně HILIC-B relativně nízká. Na koloně HILIC-N můžeme pozorovat stejný trend jako na koloně HILIC-B, tedy vzrůstající retenci analytů se zvyšováním koncentrace pufru. Pozitivně nabité analyty jsou však kolonou více zadržovány oproti koloně HILIC-B, kde je elektrostatická repulze významným faktorem ovlivňujícím retenci. Na koloně HILIC-A byla retence studovaných analytů nejvyšší ze všech tří testovaných kolon, navíc při zvyšování koncentrace pufru docházelo k mírnému poklesu retence, tedy opačnému trendu, než byl pozorován na koloně HILIC-B. Toto chování je pravděpodobně způsobeno tím, že při daném složení mobilní fáze jsou pravděpodobně minimálně disociované silanolové skupiny silikagelu a mohou se tak mírně uplatňovat kationtově výměnné interakce.

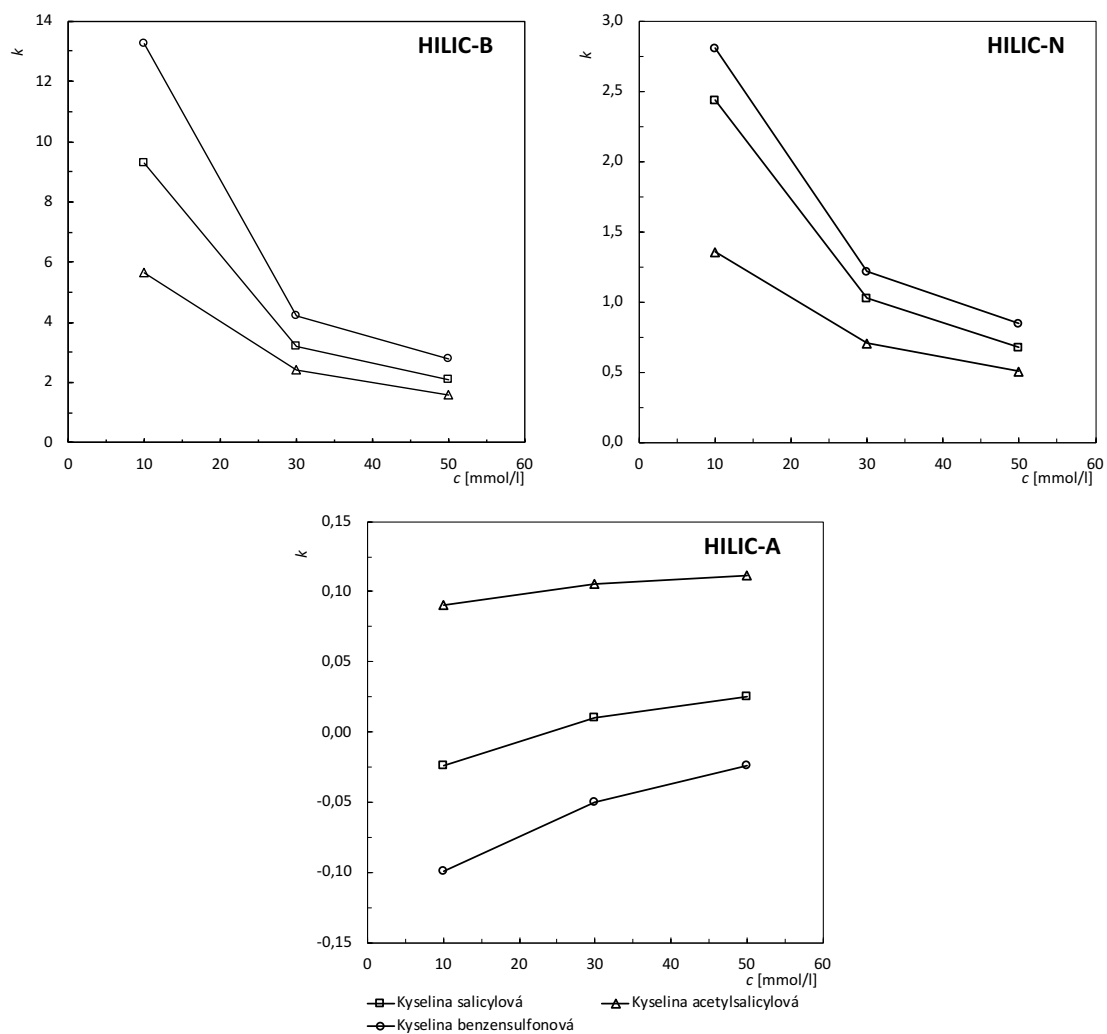


Obr 4.3: Grafy závislosti kapacitního poměru (k) na koncentraci pufru (c) pro pozitivně nabitě bazické analyty. Mobilní fáze: ACN/mravenčan amonný, pH = 3,5, 83:17 (v/v).

4.2.2 Vliv koncentrace pufru mobilní fáze na retenci kyselých analytů

Grafy z obrázku 4.4 ilustrují, že retence negativně nabitých kyselin silně závisí na iontově výměnných interakcích mezi danými analyty a studovanými stacionárními fázemi. Za daných experimentálních podmínek dochází k silné elektrostatické interakci mezi negativně nabitými funkčními skupinami analytů a pozitivně nabitým povrchem stacionární fáze kolony HILIC-B, což se projevuje vysokou retencí těchto analytů. Se zvyšující se koncentrací pufru dochází k potlačení těchto iontových interakcí, což se u testovaných analytů projevuje snížením jejich retence. U kolony HILIC-N můžeme

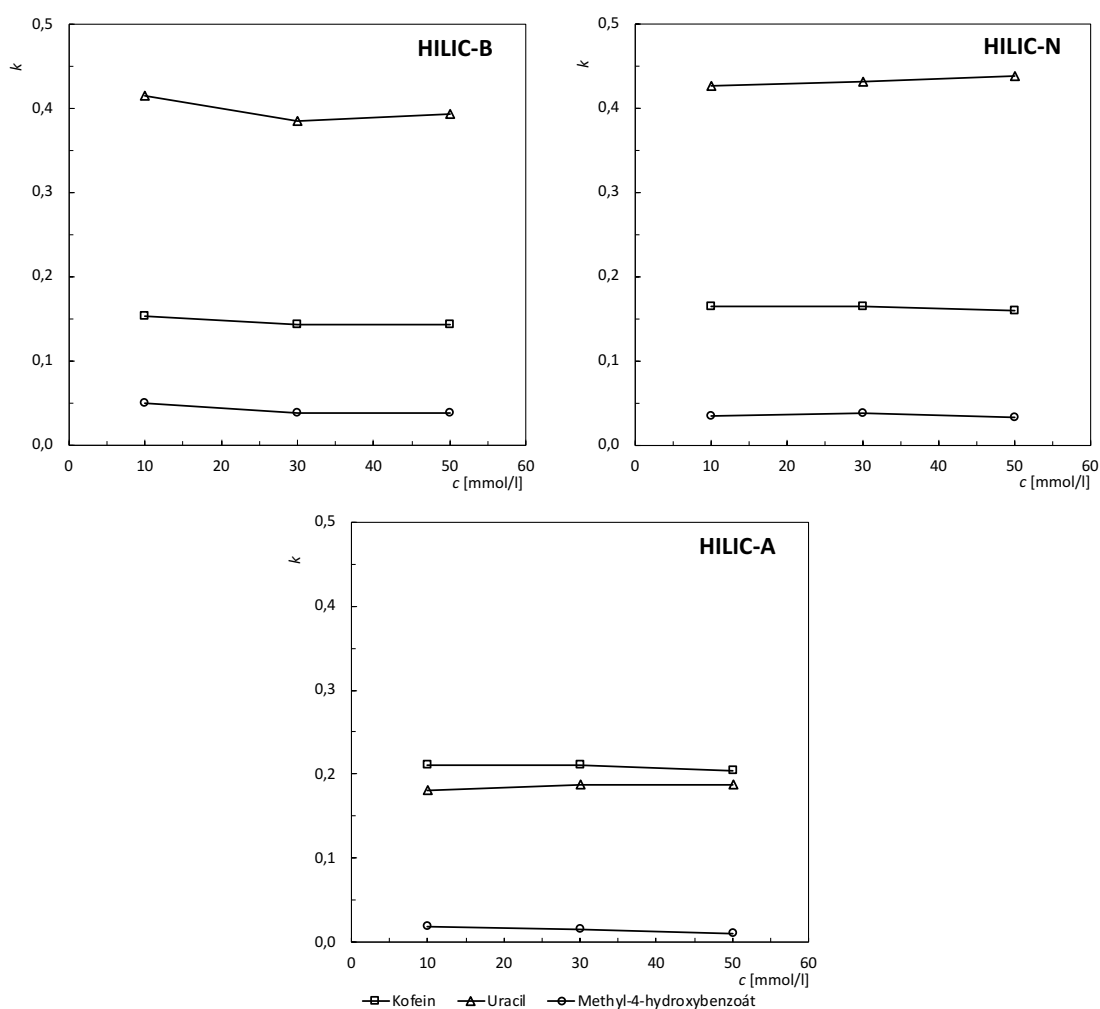
vidět stejný trend jako na koloně HILIC-B, avšak retence kyselin je v porovnání s kolonou HILIC-B výrazně nižší. Na koloně HILIC-A pak nebyly negativně nabitě analyty prakticky vůbec zadržovány.



Obr 4.4: Grafy závislosti kapacitního poměru (k) na koncentraci pufru (c) pro negativně nabitě kyselé analyty. Mobilní fáze: ACN/mravenčan amonný, pH = 3,5, 83:17 (v/v).

4.2.3 Vliv koncentrace pufru mobilní fáze na retenci neutrálních analytů

Z grafů zobrazených na Obr 4.5 je zřejmé, že retence neutrálních analytů, jako je kofein, uracil ($pK_a = 8,80$) a methyl-4-hydroxybenzoát ($pK_a = 8,50$), nebyla významně ovlivněna změnou koncentrace vodné složky mobilní fáze. Retence neutrálních analytů na kolonách HILIC-B a HILIC-N byla prakticky stejná, na koloně HILIC-A pak analyty vykazovaly retenci nižší. Methyl-4-hydroxybenzoát nebyl na kolonách prakticky vůbec zadržován, což lze očekávat vzhledem k jeho nízké hydrofilitě ($\log P = 1,64$).



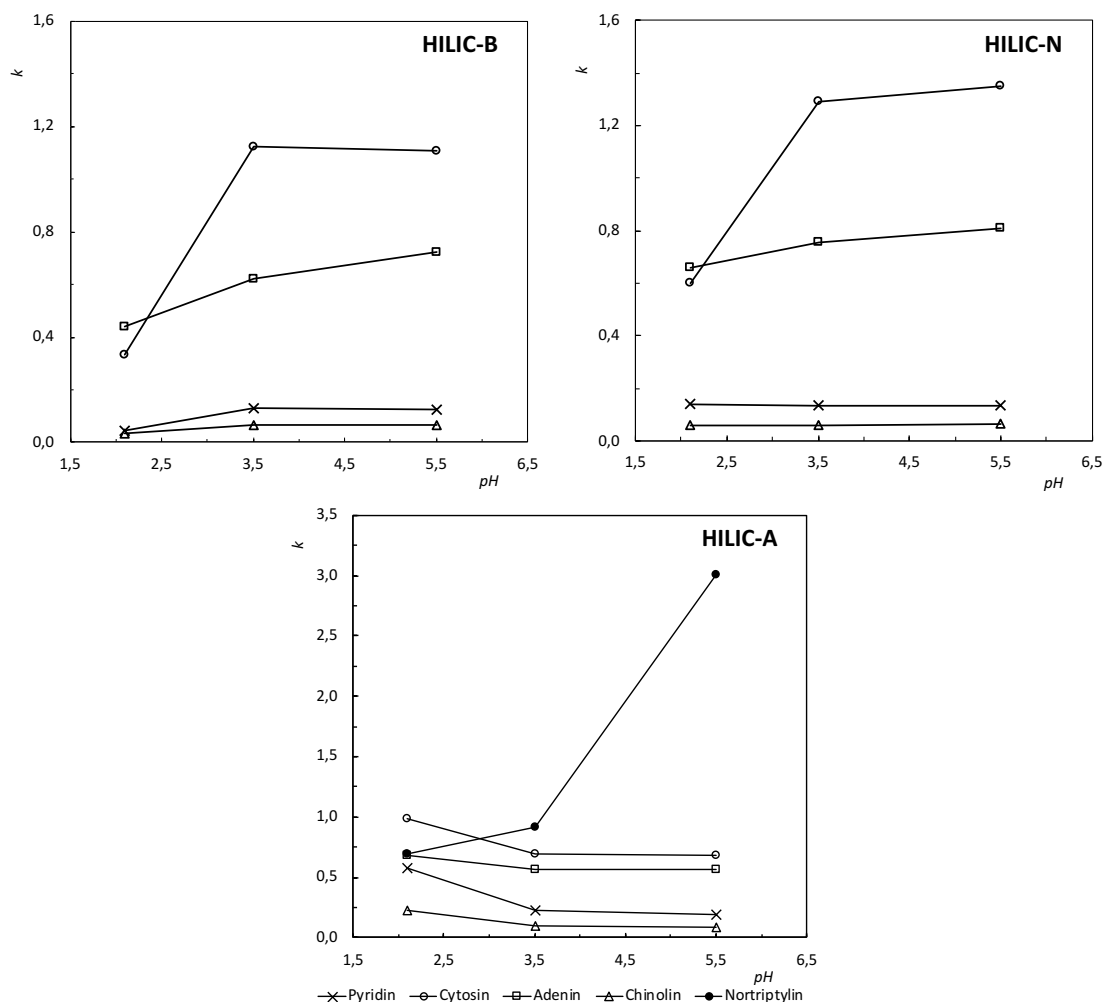
Obr 4.5: Grafy závislosti kapacitního poměru (k) na koncentraci pufru (c) pro neutrální analyty. Mobilní fáze: ACN/mravenčan amonný, pH = 3,5, 83:17 (v/v).

4.3 Vliv pH mobilní fáze na retenci

V HILIC má stejně jako koncentrace i pH vodné složky mobilní fáze významný vliv na retenci a/nebo selektivitu, jelikož ovlivňuje jak náboj stacionární fáze, tak náboj analytu. Pro testování vlivu pH pufru na retenci modelových analytů byly použity pufrы mravenčanu amonného o $\text{pH} = 2,1$ a $\text{pH} = 3,5$ a pufr octanu amonného o $\text{pH} = 5,5$. Koncentrace pufrů byla zvolena 10 mmol/l pro zvýraznění iontových interakcí. Hodnoty pH pufrů byly zvoleny v intervalu pH doporučených výrobcem testovaných kolon, který je od $\text{pH} = 2,0$ do $\text{pH} = 7,0$.

4.3.1 Vliv pH pufru mobilní fáze na retenci bazických analytů

Z grafu na Obr 4.6 pro kolonu HILIC-B můžeme vidět nárůst retence vybraných bazických analytů při zvýšení pH pufru. Při nízkém pH se opět uplatňují silné elektrostatické interakce a pozitivně nabitě analyty (pyridin $\text{p}K_a = 5,12$, cytosin $\text{p}K_a = 4,76$, adenin $\text{p}K_a = 3,66$, chinolin $\text{p}K_a = 4,50$) jsou odpuzovány z pozitivně nabitého povrchu stacionární fáze. Zvýšením pH ztrácí analyty svůj náboj a jejich retence již není tolik snižována elektrostatickou repulzí. Na koloně HILIC-N můžeme pozorovat stejný trend pro cytosin a adenin jako na koloně HILIC-B, tedy vzrůstající retenci při zvyšování pH pufru. Naopak retence adeninu a chinolinu není na koloně HILIC-N změnou pH pufru ovlivněna. Na koloně HILIC-A při $\text{pH} = 2,1$ není povrch stacionární fáze nabitý a nemůže tak docházet ke kationtově výměnným interakcím s pozitivně nabitými analyty a jejich retence je nízká. Při zvyšování pH získává povrch stacionární fáze postupně negativní náboj vlivem ionizace silanolových skupin, nicméně některé testované analyty současně přestávají být nabitě, a proto vidíme jejich snižující se retenci (pyridin, cytosin, adenin a chinolin – Obr 4.6). Zvyšování retence se zvyšováním pH a ionizací povrchu stacionární fáze kolony HILIC-A bylo pozorováno na silně bazických analytech s pozitivním nábojem v celém rozsahu testovaných pH, jako je nortriptylin ($\text{p}K_a = 10,47$), N-benzylmethyamin ($\text{p}K_a = 9,44$), 2-fenylethylamin ($\text{p}K_a = 9,79$) a BTMA viz. Příloha C. Na Obr 4.6 můžeme vidět, že iontově výměnné interakce na koloně HILIC-A jsou tak významným faktorem ovlivňujícím retenci, že nortriptylin i přes to, že není velmi hydrofilní ($\log P = 4,43$) vykazuje na koloně HILIC-A značnou retenci.

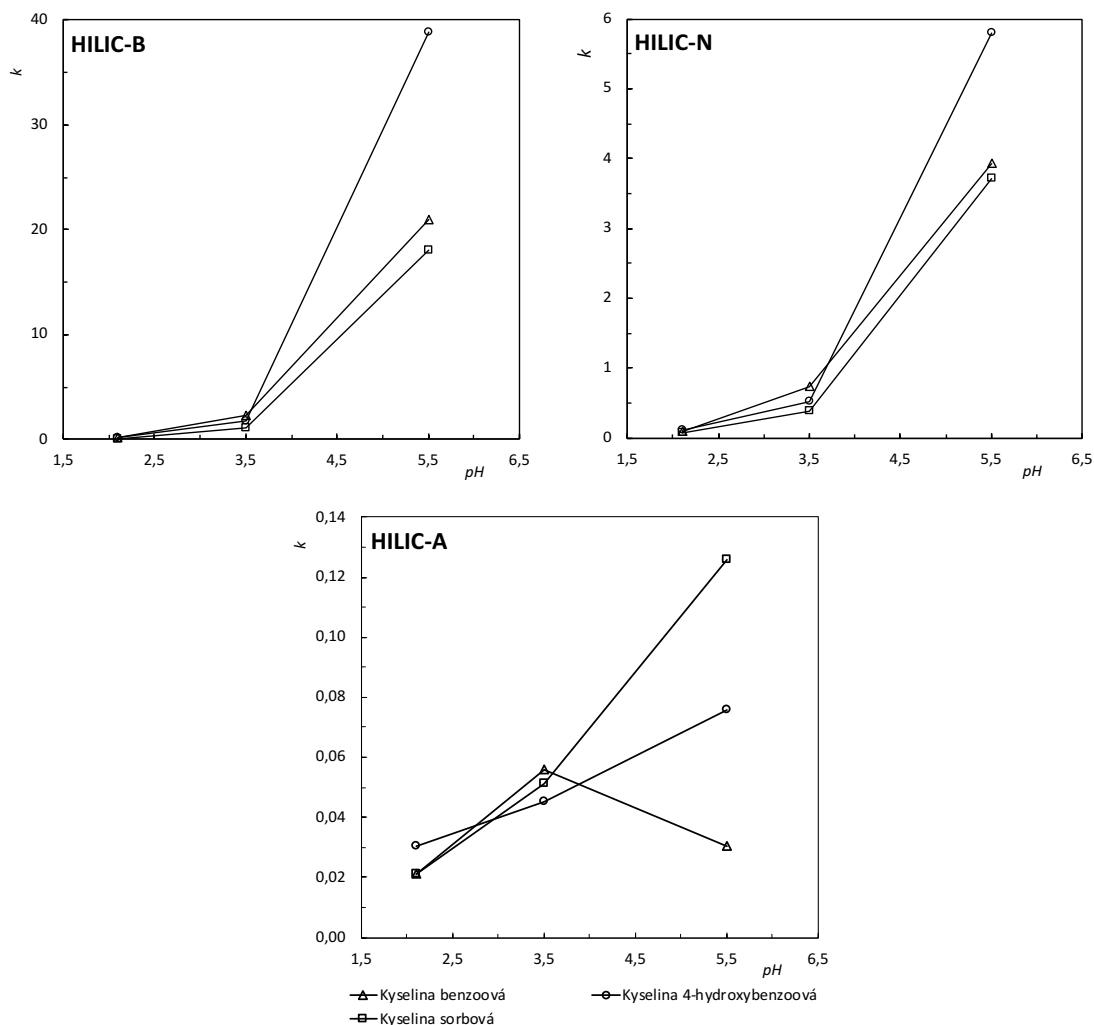


Obr 4.6 Grafy závislosti kapacitního poměru (k) na pH pufru pro bazické analyty. Mobilní fáze: ACN/10mM mravenčan amonný, pH = 2,1 a pH = 3,5, 10mM octan amonný, pH = 5,5, 83:17 (v/v).

4.3.2 Vliv pH pufru mobilní fáze na retenci kyselých analytů

Na obrázku 4.7 lze pozorovat, že při nízkém pH dochází k slabé retenci studovaných analytů jak na koloně HILIC-B tak i na koloně HILIC-N, což je způsobeno tím, že kyseliny nejsou disociovány (kyselina benzoová $pK_a = 4,08$, kyselina 4-hydroxybenzoová $pK_a = 4,38$, kyselina sorbová $pK_a = 4,78$), čímž je snížena jejich polarita. Při zvýšení pH dochází k jejich postupné disociaci, což se projeví silným nárůstem retence především na koloně HILIC-B, kde se začnou uplatňovat silné aniontové výměnné interakce. Nárůst retence při zvyšování pH pufru byl pozorován také na koloně HILIC-N, ovšem ne tak výrazný jako na koloně HILIC-B. Na koloně

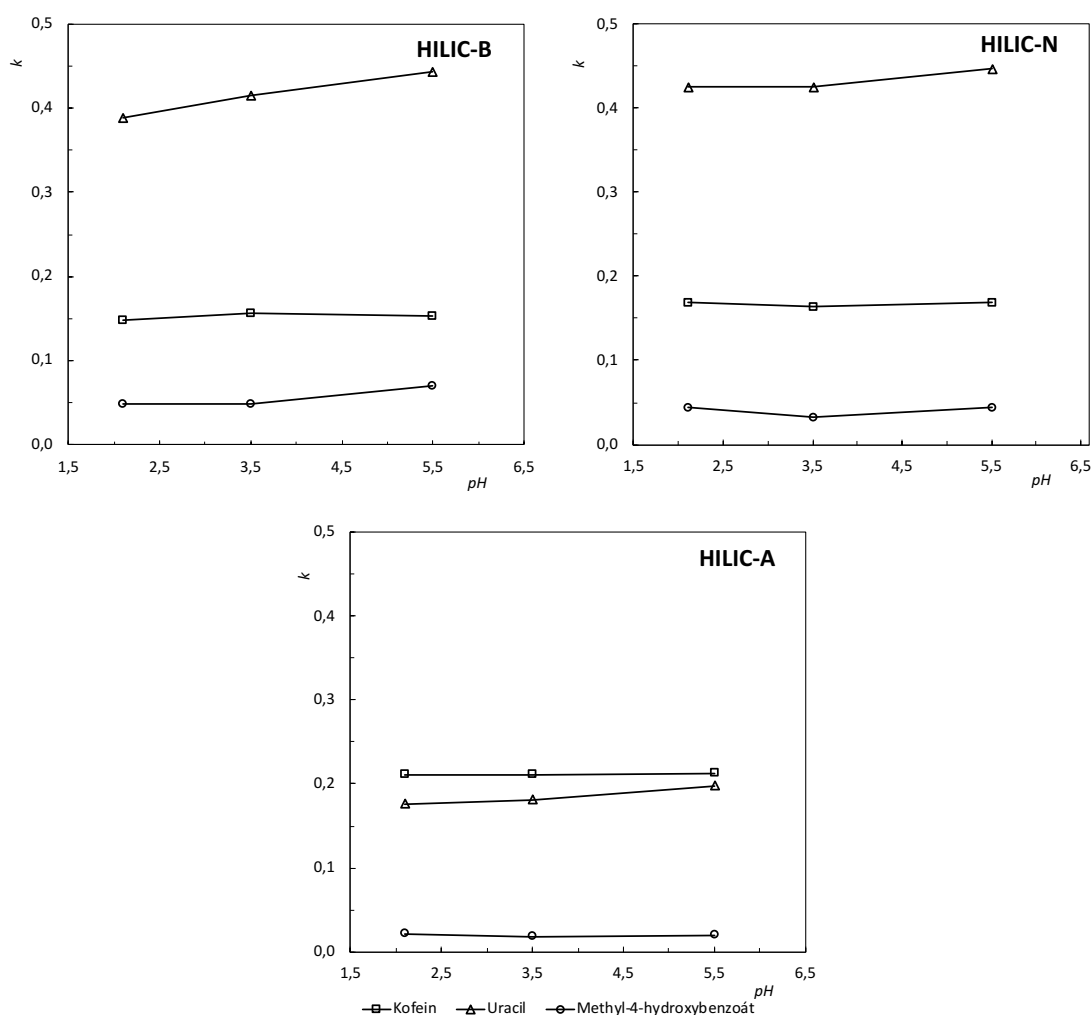
HILIC-A nejsou kyseliny zadržovány téměř vůbec. Jak již bylo uvedeno výše, při nízkém pH nebyly kyseliny disociovány, což snižuje jejich polaritu a stejně tak povrch stacionární fáze kolony HILIC-A nebyl ionizován, což vedlo k nízké retenci kyselin. Při pH pufru 5,5 byla nízká retence pravděpodobně způsobena disociací kyselin se současnou ionizací silanolových skupin silikagelové stacionární fáze kolony HILIC-A a vznikem elektrostatické repulze.



Obr 4.7 Grafy závislosti kapacitního poměru (k) na pH pufru pro kyselé analyty. Mobilní fáze: ACN/10mM mravenčan amonný, pH = 2,1 a pH = 3,5, 10mM octan amonný, pH = 5,5, 83:17 (v/v).

4.3.3 Vliv pH pufru mobilní fáze na retenci neutrálních analytů

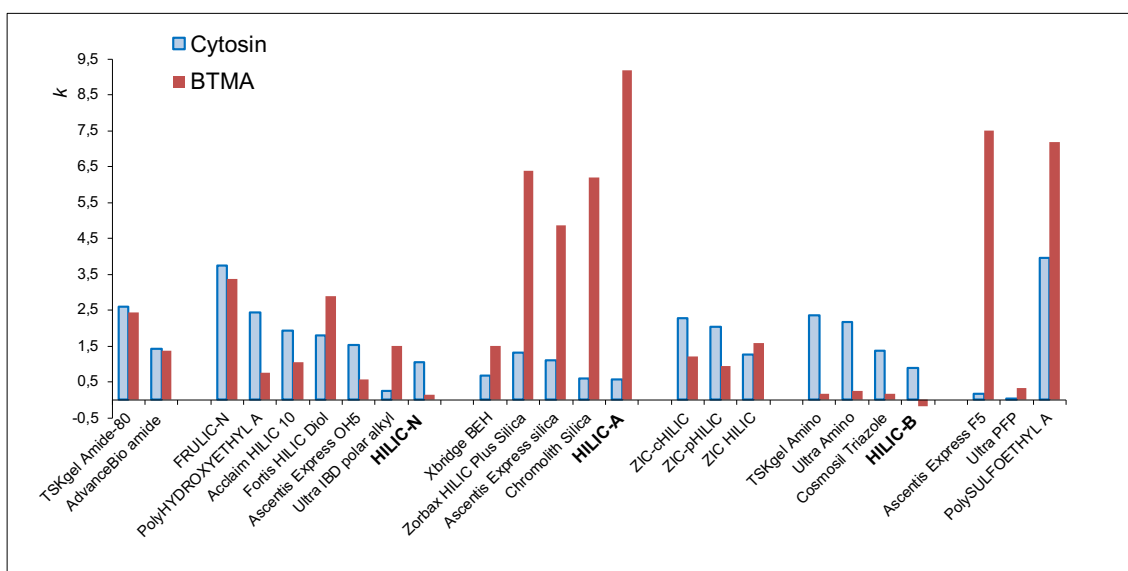
Z grafu na Obr 4.8 vidíme, že retence neutrálních analytů kofeinu, uracilu a methyl-4-hydroxybenzoátu nebyla významně ovlivněna změnou pH vodné složky mobilní fáze. Nejvyšší retenci na kolonách HILIC-B a HILIC-N vykazoval uracil, nejnižší pak methyl-4-hydroxybenzoát, a to i na koloně HILIC-A. Nejvyšší retenci na koloně HILIC-A vykazoval naopak kofein, avšak v porovnání s kolonami HILIC-B a HILIC-N byla retence neutrálních analytů na této koloně nejnižší.



Obr 4.8: Grafy závislosti kapacitního poměru (k) na pH pro neutrální analyty. Mobilní fáze: ACN/10mM mravenčan amonný, pH = 2,1 a pH = 3,5, 10mM octan amonný, pH = 5,5, 83:17 (v/v).

4.4 Retentivita kolon

Retentivita testovaných kolon byla porovnána s retentivitou 21 komerčně dostupných kolon z publikace [57], kde byl použit polární analyt cytosin, který je za daných podmínek neutrální, a pozitivně nabitě BTMA. Na Obr 4.9 je znázorněna retence modelových analytů na porovnávaných kolonách, které byly rozděleny do skupin podle typu stacionární fáze: neutrální (amid, diol), silikagelové, zwitteriontové, pozitivně a negativně nabitě.



Obr 4.9 Porovnání retenčních faktorů (k) cytosinu a BTMA získaných na různých kolonách používaných v HILIC. Mobilní fáze ACN/5mM octan amonný, pH = 6,8, 80:20 (v/v), průtok 0,5 ml/min.

Z Obr 4.9 můžeme vidět, že retence cytosinu na koloně HILIC-N je vyšší ve srovnání s jeho retencí na koloně Ultra IBD polar alkyl, nicméně ostatní kolony obsahující neutrální stacionární fázi vykazují retenci cytosinu vyšší. Na koloně HILIC-A byla retence cytosinu nejnižší ve srovnání s kolonami obsahujícími stacionární fázi z nemodifikovaného silikagelu a stejně tak byla retence cytosinu nejnižší na koloně HILIC-B ve srovnání s kolonami s pozitivně nabitým povrchem stacionární fáze. Obecně lze tedy říci, že retentivita testovaných kolon, z pohledu retence cytosinu, je ve srovnání s ostatními 21 kolonami nižší.

Dále je z Obr 4.9 patrné, že retence BTMA je z kolon se stacionární fází z nemodifikovaného silikagelu nejvyšší na koloně HILIC-A. Stacionární fáze kolony

HILIC-A je při pH = 6,8 negativně nabitá a vlivem kationtově výměnných interakcí vykazuje vysokou retenci pozitivně nabitého BTMA. Retence BTMA na koloně HILIC-A je také vyšší ve srovnání s jeho retencí na kolonách Ascentis Express F5 a PolySULFOETHYL A, které obsahují negativně nabitě stacionární fáze. Povrch stacionární fáze kolony HILIC-B je naopak za daných experimentálních podmínek pozitivně nabitý a uplatňují se zde dominantní aniontově výměnné interakce, což má za následek eluci BTMA před mrtvým časem kolony. Tento jev se u zbývajících kolon s pozitivně nabitými povrchy stacionárních fází neprojevil.

4.5 Vliv koncentrace a pH pufru mobilní fáze na retenci peptidů

Vliv koncentrace a pH pufru byl zkoumán i na retenci a selektivitu peptidů. Měření bylo prováděno za stejných podmínek jako u sady modelových analytů, tedy poměr acetonitrilu a pufru byl 83:17 (v/v), k testování vlivu koncentrace pufru na retenci peptidů byl použit mravenčan amonný, pH = 3,5 a koncentracích 10, 30 a 50 mmol/l. Pro testování vlivu pH pufru na retenci peptidů byly použity 10mmol/l pufr mravenčanu amonného o pH = 2,1 a pH = 3,5 a 10mmol/l pufr octanu amonného o pH = 5,5.

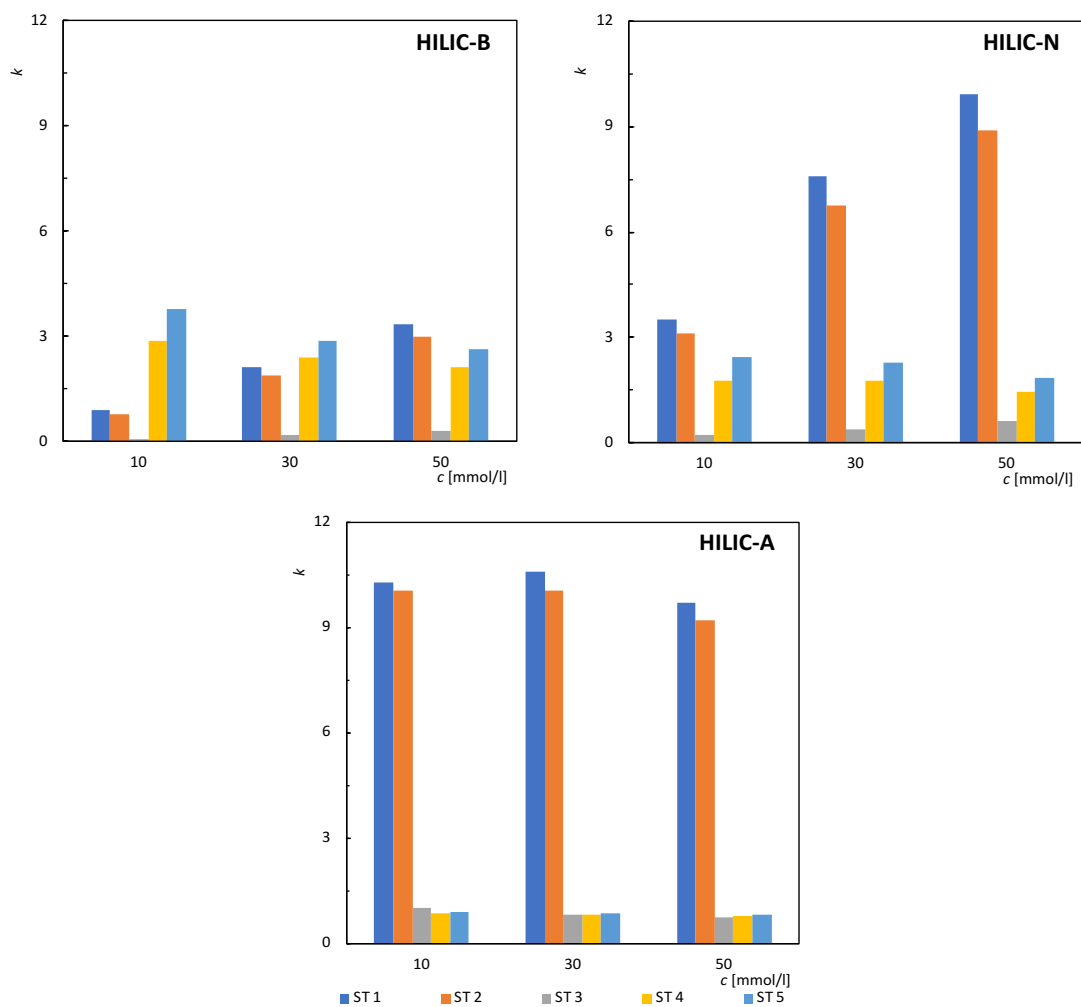
4.5.1 Vliv koncentrace pufru mobilní fáze na retenci peptidů

Na základě naměřených dat (viz. Příloha D), byly sestrojeny grafy znázorněné na Obr 4.10. Tyto grafy ilustrují, že se retence nonapeptidů [Lys⁸] vasopresinu a [Arg⁸] vasotocinu na koloně HILIC-B snižovala při snižování koncentrace pufru, vlivem odpuzování pozitivně nabitých peptidů, jejichž celkový náboj je při daném pH +2, z pozitivně nabitého povrchu kolony. Stejný trend byl pozorován i u pentapeptidu leucin enkefalin amidu, jehož celkový náboj je +1. Pentapeptidy leucin enkefalin amid, leucin enkefalin a [Met⁵] enkefalin, jsou ve srovnání s nonapeptidy méně hydrofilní ([Lys⁸] vasopresin $\log P = -5,92$, [Arg⁸] vasotocin $\log P = -7,08$, leucin enkefalin amid $\log P = -0,41$, leucin enkefalin $\log P = 0,40$ a [Met⁵] enkefalin $\log P = -0,2$), což přispívá k jejich nižší retenci. Leucin enkefalin amid a leucin enkefalin mají stejnou strukturu, až na jednu karboxylovou skupinu u leucin enkefalinu. Vlivem přítomnosti této karboxylové skupiny ($pK_a = 3,7$), která je při pH = 3,5 částečně deprotonována, se pak může z části uplatňovat aniontově výměnná interakce mezi peptidem a pozitivně nabitým povrchem kolony HILIC-B a docházet tak ke zvyšování retence při snižování koncentrace pufru. [Met⁵] enkefalin také obsahuje částečně deprotonovanou karboxylovou skupinu ($pK_a = 3,61$), díky které se i u něj retence zvyšuje se snižující se koncentrací pufru.

Dále můžeme na Obr 4.10 vidět, že na koloně HILIC-N byl opět pozorován stejný trend jako na koloně HILIC-B. Retence [Lys⁸] vasopresinu, [Arg⁸] vasotocinu a leucin enkefalin amidu opět klesala při snižování koncentrace pufru, nicméně v porovnání s retencí na koloně HILIC-B byla podstatně vyšší. Retence leucin enkefalinu a [Met⁵] enkefalinu opět roste při snižování koncentrace pufru, avšak v porovnání s retencí peptidů

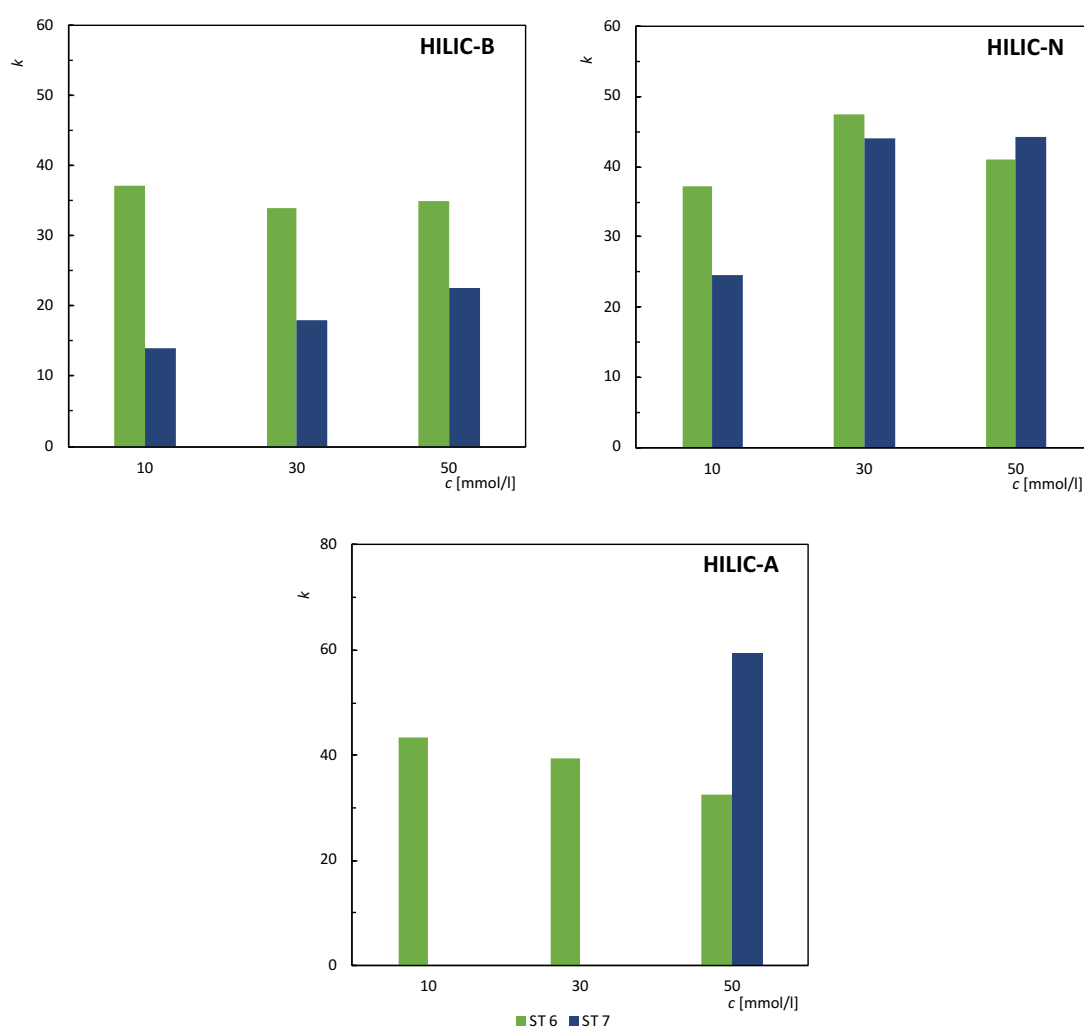
na koloně HILIC-B je nižší. Na základě naměřených dat se zdá, že i na koloně HILIC-N se pravděpodobně uplatňují iontové interakce, avšak v podstatně menší míře, než na koloně HILIC-B.

Na koloně HILIC-A, jejíž povrch byl při $\text{pH} = 3,5$ minimálně nabitý, neměla změna koncentrace na retenci peptidů významný vliv. V porovnání s kolonou HILIC-N a HILIC-B, vykazují $[\text{Lys}^8]$ vasopresin, $[\text{Arg}^8]$ vasotocin a leucin enkefalin amid vyšší retenci.



Obr 4.10 Grafy závislosti kapacitního poměru (k) na koncentraci pufru (c), ST 1 - $[\text{Lys}^8]$ vasopresin, ST 2 - $[\text{Arg}^8]$ vasotocin, ST 3 - leucin enkefalin amid, ST 4 - leucin enkefalin, ST 5 - $[\text{Met}^5]$ enkefalin. Mobilní fáze: ACN/mravenčan amonný, $\text{pH} = 3,5$, 83:17 (v/v).

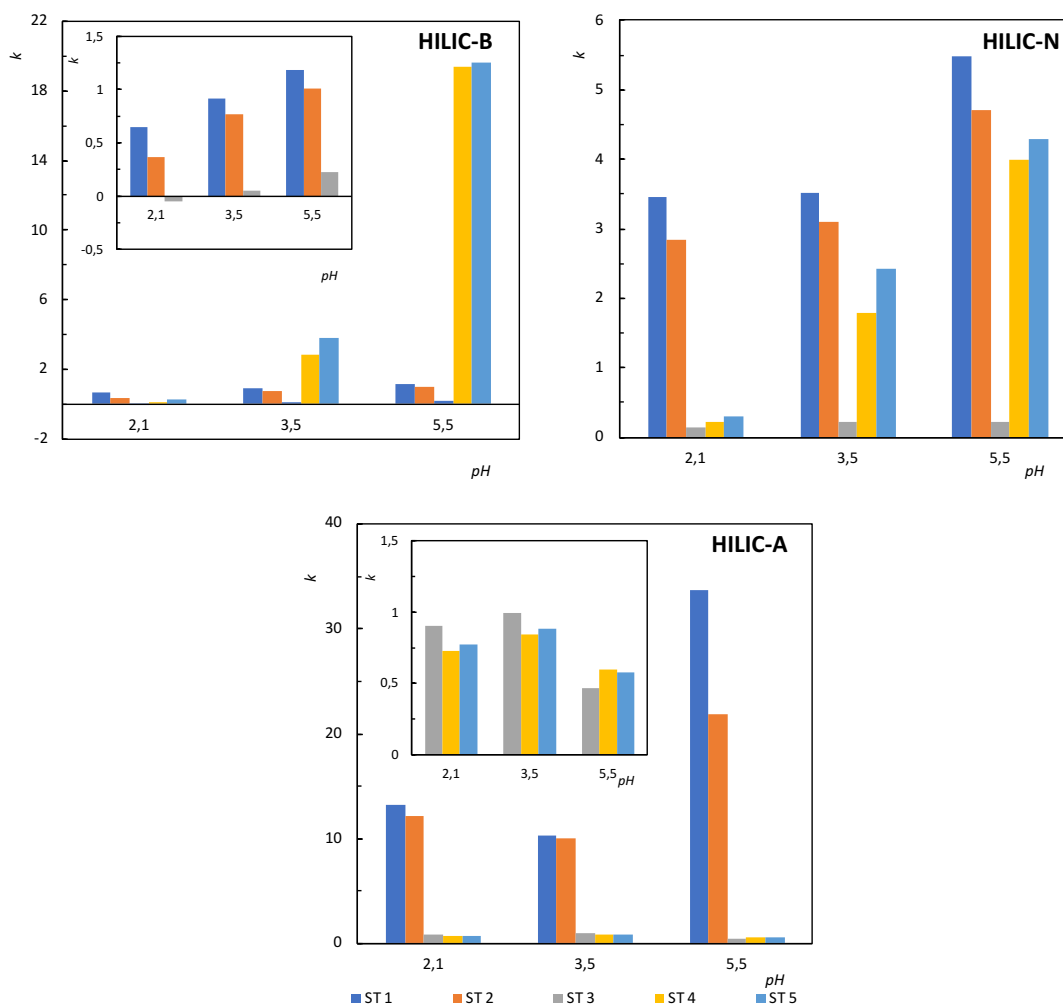
Na Obr 4.11 je pak znázorněn vliv koncentrace pufru mobilní fáze na retenci angiotensinů, které vykazovaly na testovaných kolonách podstatně vyšší retenci ve srovnání s nonapeptidy a pentapeptidy. Na koloně HILIC-A se retence angiotensinu II snižovala při zvyšování koncentrace pufru, avšak na koloně HILIC-B nebyla příliš ovlivněna. Retence angiotensinu I byla nejnižší na koloně HILIC-B a nejvyšší na koloně HILIC-A. Na koloně HILIC-A nebylo možné určit dobu eluce peptidu při koncentracích pufru 30 mmol/l a 10 mmol/l kvůli přílišnému rozmytí píku a odezvě pod mezí detekce. Na koloně HILIC-B a HILIC-N se retence angiotensinu I snižovala při snižování koncentrace pufru, na koloně HILIC-B byla však retence angiotensinu I nižší.



Obr 4.11 Grafy závislosti kapacitního poměru (k) na koncentraci pufru (c), ST 6 - angiotensin II, ST 7 - angiotensin I. Mobilní fáze: ACN/mravenčan amonný, pH = 3,5, 83:17 (v/v).

4.5.2 Vliv pH pufru mobilní fáze na retenci peptidů

Hodnota pH pufru měla výrazný vliv na retenci peptidů na testovaných kolonách. Na koloně HILIC-B, jak můžeme vidět na Obr 4.12, se vliv pH nejvíce projevil na retenci pentapeptidů leucin enkefalinu a [Met⁵] enkefalinu. Při pH = 2,1 nebyly karboxylové skupiny peptidů deprotonované, nemohly se tedy uplatňovat iontově výměnné interakce a docházelo pouze k odpuzování pozitivně nabitých peptidů z povrchu stacionární fáze, což vedlo k relativně nízké retenci těchto peptidů. Při pH = 5,5 byly karboxylové skupiny již plně deprotonovány a retence těchto peptidů se výrazně zvýšila vlivem iontových interakcí. K mírnému nárůstu retence docházelo i u [Lys⁸] vasopresinu, [Arg⁸] vasotocinu a leucin enkefalin amidu, jejichž náboje se v rozmezí testovaných hodnot pH nemění. Změna retence byla pravděpodobně způsobena tím, že vyšší pH pufru ovlivnilo náboj nezreagovaných zbytkových silanolových skupin na povrchu aminopropylové stacionární fáze, která obsahuje pozitivně nabitě funkční skupiny, a tak i u těchto peptidů mohly přispívat k retenci kationtově výměnné interakce současně s elektrostatickým odpuzováním. Na koloně HILIC-N byl opět pozorován stejný trend jako na koloně HILIC-B. I zde docházelo pravděpodobně k ionizaci zbytkových silanolových skupin stacionární fáze. To by vysvětlovalo vyšší retenci nonapeptidů a leucin enkefalin amidu, která by oproti koloně HILIC-B nebyla snižována tak silnou elektrostatickou repulzí, ale pravděpodobně převážně zvyšována kationtově výměnnými interakcemi, především při pH = 5,5. Retence leucin enkefalinu a [Met⁵] enkefalinu je pak výrazně nižší oproti koloně HILIC-B. Na koloně HILIC-A byla retence pozitivně nabitých nonapeptidů nejvyšší a při pH = 5,5 došlo, dle očekávání, k jejímu velkému nárůstu. Zvýšení retence bylo způsobeno vlivem kationtově výměnných interakcí mezi pozitivně nabitými nonapeptidy [Lys⁸] vasopresinem a [Arg⁸] vasotocinem a negativně nabitým povrchem stacionární fáze kolony HILIC-A. Opačný trend byl pozorován u leucin enkefalinu a [Met⁵] enkefalinu, kde naopak při pH = 5,5 docházelo k elektrostatické repulzi mezi deprotonovanými, negativně nabitými karboxylovými skupinami pentapeptidů a negativně nabitým povrchem stacionární fáze kolony. Retence pentapeptidů byla na koloně HILIC-A velmi nízká ve srovnání s jejich retencí na kolonách HILIC-B a HILIC-N.



Obr 4.12 Grafy závislosti kapacitního poměru (k) na pH pufru, ST 1 - [Lys⁸] vasopresin, ST 2 - [Arg⁸] vasotocin, ST 3 - leucin enkefalin amid, ST 4 - leucin enkefalin, ST 5 - [Met⁵] enkefalin. Mobilní fáze: ACN/mravenčan amonný, pH = 3,5, 83:17 (v/v).

Vliv pH pufru byl pozorován i na retenci angiotensinů, viz. Příloha E. Na koloně HILIC-B nebylo možné odečíst jejich retenci při pH = 5,5 a na koloně HILIC-A u angiotensinu I při pH = 2,1 a pH = 3,5, kvůli přílišnému rozmytí píků a odezvě pod mezí detekce. I přes to, že nebylo možné detegovat angiotensiny při pH = 5,5 na koloně HILIC-B, byl pozorován velký nárůst retence (především u celkově méně pozitivně nabitého angiotensinu II) při zvýšení pH z hodnoty 2,1 na 3,5. Zvyšováním pH se snižoval pozitivní náboj angiotensinů a snižovala se tak i velikost elektrostatické repulze s pozitivně nabitým povrchem kolony HILIC-B.

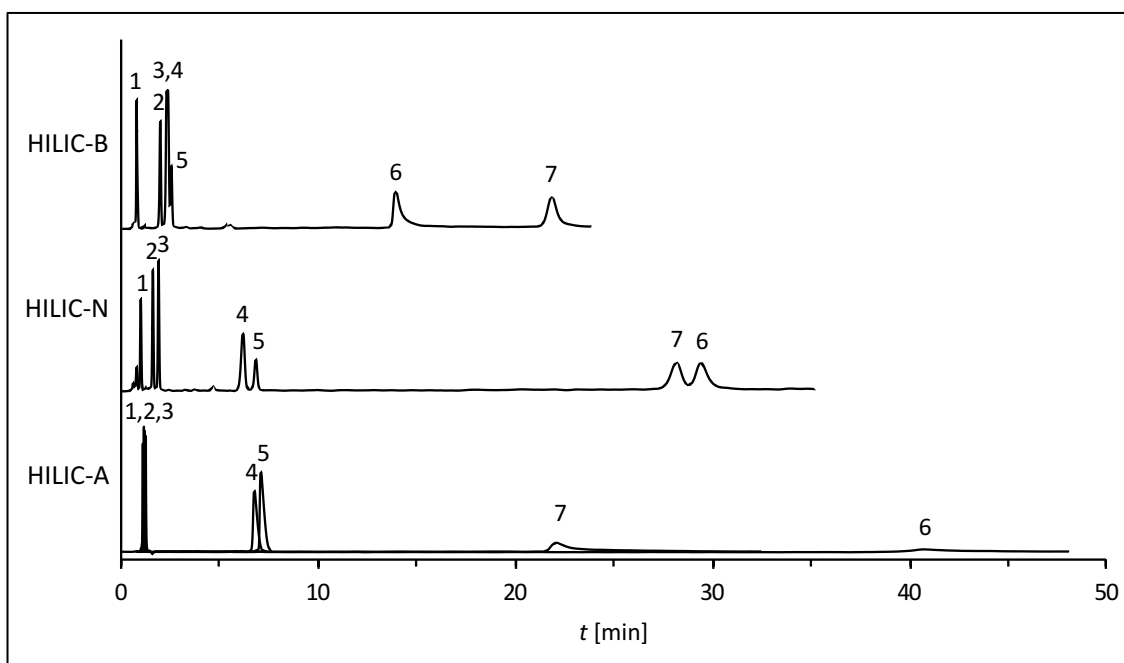
Na koloně HILIC-A pak retence angiotensinu II byla nejvyšší při pH = 3,5

a nejnižší při pH = 2,1. Při nízkém pH není stacionární fáze kolony HILIC-A nabitá a není tak retence pozitivně nabitého angiotensinu II zvyšována kationtově výměnnými interakcemi. Zvýšením pH pak dochází k disociaci silanolových skupin stacionární fáze a vzniku negativního náboje, avšak zároveň dochází také ke snižování pozitivního náboje angiotensinu II. Angiotensin I vykazoval při pH = 5,5 ve srovnání s angiotensinem II vyšší retenci, což bylo pravděpodobně způsobeno jeho vyšší hodnotou celkového pozitivního náboje za těchto podmínek.

Na koloně HILIC-N docházelo k výraznému zvýšení retence angiotensinů při zvyšování pH. Důvodem byla pravděpodobně stejně jako u nonapeptidů a leucin enkefalin amidu disociace nezreagovaných zbytkových silanolových skupin stacionární fáze a možnost kationtově výměnných interakcí mezi pozitivně nabitými angiotensiny a negativně nabitým povrchem stacionární fáze. Ve srovnání s retencí angiotensinů na koloně HILIC-B byla jejich retence při pH = 2,1 vyšší na koloně HILIC-N. Retence angiotensinu I při pH = 3,5 byla srovnatelná na obou kolonách, nicméně více pozitivně nabitý angiotensin II vykazoval vyšší retenci na koloně HILIC-N.

4.6 Separace peptidů na studovaných kolonách

Studované kolony vykazovaly rozdílnou retenci a selektivitu při analýze vybraných peptidů. Na Obr 4.13 jsou zobrazeny chromatogramy peptidů na testovaných kolonách, získané za stejných experimentálních podmínek. Chromatogramy kolon HILIC-B a HILIC-N byly získány analýzou směsi peptidů. U chromatogramu kolony HILIC-A se jedná o překryv chromatogramů jednotlivých analýz, neboť při analýze směšného vzorku peptidů nebyly angiotensiny detegovány.



Obr 4.13 Separace peptidů na testovaných kolonách. 1 - leucin enkefalin amid, 2 - leucin enkefalin, 3 - [Met⁵] enkefalin, 4 - [Arg⁸] vasotocin, 5 - [Lys⁸] vasopresin, 6 - angiotensin I, 7 - angiotensin II. Mobilní fáze: ACN/50mM mravenčan amonný, pH = 3,5, 83:17 (v/v), spektrofotometrická detekce při vlnové délce 220 nm.

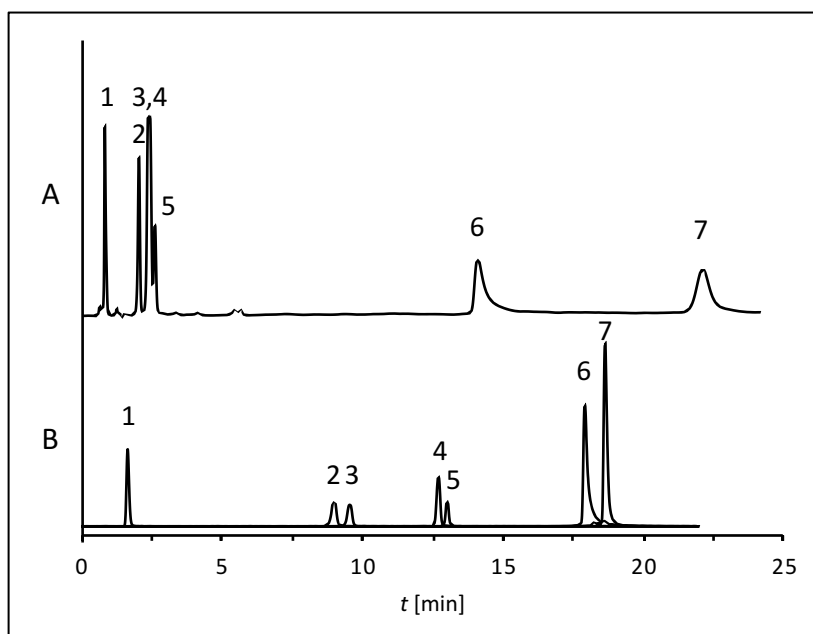
Z Obr 4.13 je zřejmé, že ve srovnání s kolonou HILIC-B, došlo ke změně selektivity angiotensinů na kolonách HILIC-N a HILIC-A. Dále z Obr 4.13 vidíme, že nejkratší doba analýzy peptidů byla získána na koloně HILIC-B, kde však docházelo ke koeluci [Met⁵] enkefalinu a [Arg⁸] vasotocinu. Na koloně HILIC-N byly peptidy nejlépe rozděleny ze všech tří kolon a píky vykazovaly nejlepší symetrii (viz. Tab 4.3), nicméně doba analýzy byla poměrně dlouhá. Na koloně HILIC-A docházelo ke koeluci pentapeptidů i nonapeptidů a píky angiotensinů byly velmi rozmyté. Doba analýzy navíc

trvala více než 40 minut. Za účelem zlepšení rozlišení a doby analýzy byla proto provedena analýza za použití gradientové eluce.

Gradientové eluce byly prováděny na UHPLC systému spojeném s hmotnostním spektrometrem. Chromatogramy získané pomocí hmotnostního detektoru jsou uváděny jako překryté poměry m/z charakteristické pro jednotlivé peptidy, které byly vyextrahovány z celkového hmotnostního spektra směsi peptidů. Na Obr 4.14, Obr 4.15 a Obr 4.16 jsou zobrazeny chromatogramy směsi peptidů na koloně HILIC-B, HILIC-N a HILIC-A za použití isokratické a gradientové eluce.

V Tab 4.2, Tab 4.3 a Tab 4.4 jsou uvedeny hodnoty kapacitních poměrů, faktorů chvostování a rozlišení pro analyzované peptidy získané jak při isokratické, tak i při gradientové eluci. Hodnoty faktorů chvostování v případě isokratické eluce byly použity z chromatogramů jednotlivých peptidů pro možnost jejich porovnání s faktory chvostování z gradientové eluce.

Na Obr 4.14 vidíme porovnání isokratické a gradientové eluce směsi studovaných peptidů na koloně HILIC-B. Z grafu je zřejmé, že při gradientové eluci došlo ke zkrácení doby analýzy, a především ke zvýšení retence nonapeptidů [Arg⁸] vasotocinu a [Lys⁸] vasopresinu a pentapeptidů leucin enkefalinu a [Met⁵] enkefalinu, které při isokratické eluci eluovaly v podobnou dobu. Porovnáme-li hodnoty faktorů chvostování uvedené v Tab 4.2, můžeme říci, že došlo ke zlepšení symetrie leucin enkefalin amidu a angiotensinu I, naopak symetrie angiotensinu II se zhoršila. Dále můžeme v Tab 4.2 vidět, že došlo k podstatnému zvýšení rozlišení mezi [Met⁵] enkefalinem a [Arg⁸] vasotocinem (z hodnoty 0,14 na 10,39) a také mezi [Arg⁸] vasotocinem a [Lys⁸] vasopresinem (z hodnoty 0,55 na 1,15). Naopak mezi píky angotensinu I a angiotensinu II se při použití gradientové eluce rozlišení podstatně snížilo (z hodnoty 10,96 na 1,05).

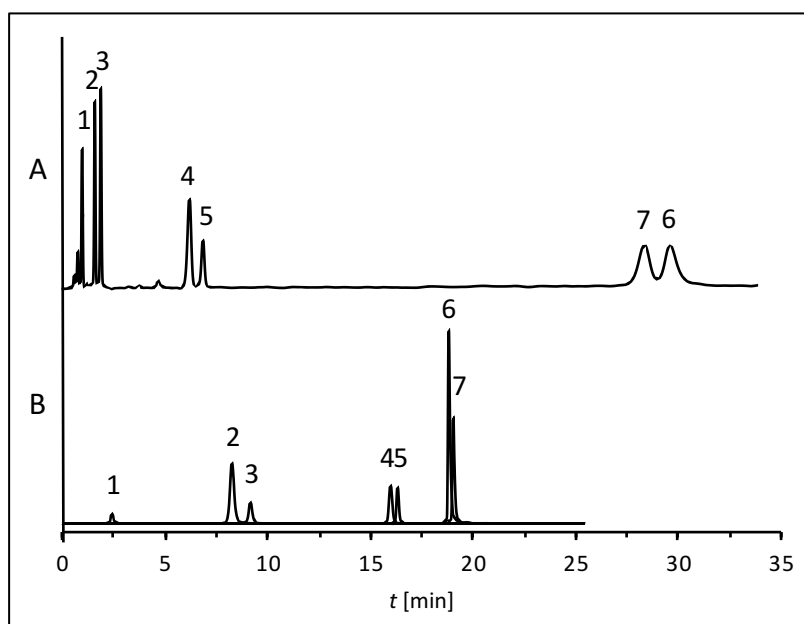


Obr 4.14 Chromatogramy směsi peptidů na koloně HILIC-B. A) Isokratická eluce za použití DAD detektoru B) Gradientová eluce za použití MS detektoru. 1 - leucin enkefalin amid, 2 - leucin enkefalin, 3 - [Met⁵] enkefalin, 4 - [Arg⁸] vasotocin, 5 - [Lys⁸] vasopresin, 6 - angiotensin I, 7 - angiotensin II. Mobilní fáze pro isokratickou eluci: ACN/50mM mravenčan amonný, pH = 3,5, 83:17 (v/v). Mobilní fáze pro gradientovou eluci: viz. kapitola 3.5 Tab 3.2.

Tab 4.2 Kapacitní poměry (k), faktory chvostování (T_f) a rozlišení (R_s) pro směs peptidů na koloně HILIC-B při použití isokratické a gradientové eluce.

Peptid	Isokratická eluce			Gradientová eluce		
	k	T_f	R_s	k	T_f	R_s
Leucin enkefalin amid	0,26	1,4	–	1,70	1,2	–
Leucin enkefalin	2,20	0,9	10,96	13,74	0,9	20,21
[Met⁵] enkefalin	2,73	1,0	1,17	14,65	1,0	1,42
[Arg⁸] vasotocin	2,83	1,0	0,14	19,83	1,0	10,39
[Lys⁸] vasopresin	3,11	1,0	0,55	20,34	1,0	1,15
Angiotensin I	21,48	2,9	30,74	28,36	2,8	11,41
Angiotensin II	34,26	1,5	10,96	29,55	1,7	1,05

Obr. 4.15 znázorňuje porovnání isokratické a gradientové eluce směsi studovaných peptidů na koloně HILIC-N. Opět můžeme vidět, že použitím gradientové eluce byla zkrácena doba analýzy, a to o více než 10 minut. Také se zvýšila retence nonapeptidů [Arg⁸] vasotocinu a [Lys⁸] vasopresinu a pentapeptidů leucin enkefalinu a [Met⁵] enkefalinu. Naopak na retenci pentapeptidu leucin enkefalin amidu neměla, stejně jako tomu bylo na koloně HILIC-B, gradientová eluce velký vliv. Dále můžeme vidět, že při gradientové eluci došlo, ve srovnání s isokratickou elucí, ke změně selektivity angiotensinů. Porovnáním hodnot faktorů chvostování z Tab 4.3 lze pak říci, že při gradientové eluci došlo u všech peptidů k mírnému zhoršení jejich symetrie. Porovnáním hodnot rozlišení pak můžeme vidět, že použitím gradientové eluce se snížilo rozlišení především mezi [Lys⁸] vasopresinem a angiotensinu, a to z hodnoty 33,12 při isokratické eluci na hodnotu 7,50 při gradientové eluci.

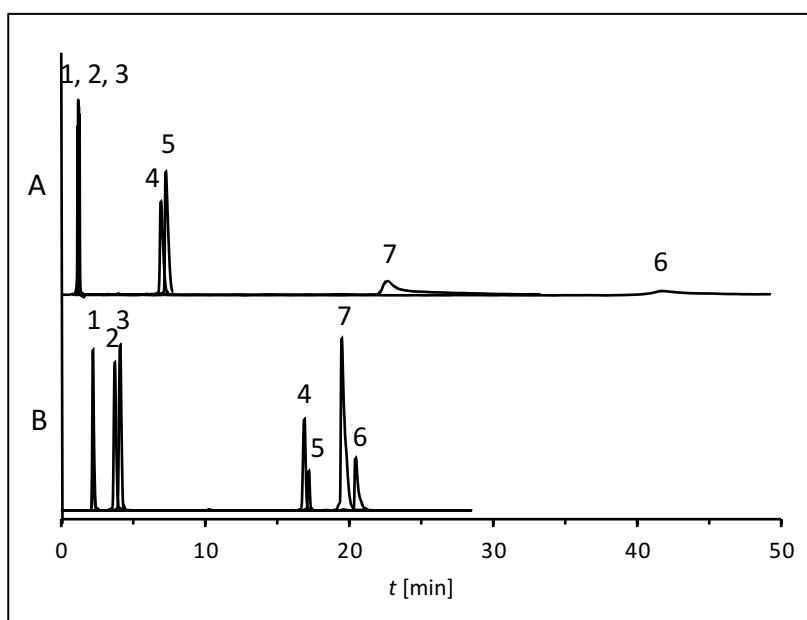


Obr 4.15 Chromatogramy směsi peptidů na koloně HILIC-N. A) Isokratická eluce za použití DAD detektoru B) Gradientová eluce za použití MS detektoru. 1 - leucin enkefalin amid, 2 - leucin enkefalin, 3 - [Met⁵] enkefalin, 4 - [Arg⁸] vasotocin, 5 - [Lys⁸] vasopresin, 6 - angiotensin I, 7 - angiotensin II. Mobilní fáze pro isokratickou eluci: ACN/50mM mravenčan amonný, pH = 3,5, 83:17 (v/v). Mobilní fáze pro gradientovou eluci: viz. kapitola 3.5 Tab 3.2.

Tab 4.3 Kapacitní poměry (k), faktory chvostování (T_f) a rozlišení (R_s) pro směs peptidů na koloně HILIC-N při použití isokratické a gradientové eluce.

Isokratická eluce				Gradientová eluce			
Peptid	k	T_f	R_s	Peptid	k	T_f	R_s
Leucin enkefalin amid	0,60	1,1	–	Leucin enkefalin amid	2,93	1,2	–
Leucin enkefalin	1,60	1,0	5,32	Leucin enkefalin	12,54	1,1	15,37
[Met ⁵] enkefalin	2,06	1,0	2,46	[Met ⁵] enkefalin	13,98	1,1	2,21
[Arg ⁸] vasotocin	8,97	0,9	18,73	[Arg ⁸] vasotocin	25,17	1,2	21,20
[Lys ⁸] vasopresin	10,03	0,9	2,15	[Lys ⁸] vasopresin	25,75	1,1	1,07
Angiotensin II	44,44	1,0	33,12	Angiotensin I	29,83	1,7	7,50
Angiotensin I	46,44	1,5	1,20	Angiotensin II	30,19	1,5	0,60

Na Obr 4.16 můžeme vidět porovnání isokratické a gradientové eluce směsi studovaných peptidů na koloně HILIC-A. Z grafu je zřejmé, že i na koloně HILIC-A došlo při gradientové eluci ke zkrácení doby analýzy, které bylo na této koloně nejvýraznější. Doba analýzy se zkrátila téměř o polovinu. Opět se zvýšila při gradientové eluci retence nonapeptidů [Arg⁸] vasotocinu a [Lys⁸] vasopresinu i pentapeptidů leucin enkefalinu a [Met⁵] enkefalinu, u nichž při isokratické eluci docházelo ke koeluci píků společně s leucin enkefalin amidem. Zvýšení retence leucin enkefalinu a [Met⁵] enkefalinu bylo však oproti kolonám HILIC-B a HILIC-N nižší. Při porovnání hodnot faktorů chvostování z Tab 4.4 je vidět, že při gradientové eluci se zlepšila symetrie především [Arg⁸] vasotocinu z hodnoty při isokratické eluci 1,8 na 1,0, [Lys⁸] vasopresinu z hodnoty 2,3 na 1,0 a angiotensinu II z hodnoty 3,5 na 2,4. Dále můžeme z Tab 4.4 vidět, že také na koloně HILIC-A se při gradientové eluci snížilo rozlišení mezi angiotensiny z hodnoty 7,56 na 1,25, dále došlo ke zvýšení rozlišení mezi leucin enkefalin amidem a leucin enkefalinem z hodnoty 0,19 na 3,06 a naopak rozlišení mezi [Arg⁸] vasotocinem a [Lys⁸] vasopresinem se prakticky nezměnilo (hodnota 0,85 při isokratické eluci a 0,88 při gradientové eluci).



Obr 4.16 Chromatogramy směsi peptidů na koloně HILIC-A. A) Isokratická eluce za použití DAD detektoru B) Gradientová eluce za použití MS detektoru. 1 - leucin enkefalin amid, 2 - leucin enkefalin, 3 - [Met⁵] enkefalin, 4 - [Arg⁸] vasotocin, 5 - [Lys⁸] vasopresin, 6 - angiotensin I, 7 - angiotensin II. Mobilní fáze pro isokratickou eluci: ACN/50mM mravenčan amonný, pH = 3,5, 83:17 (v/v). Mobilní fáze pro gradientovou eluci: viz. kapitola 3.5 Tab 3.2.

Tab 4.4 Kapacitní poměry (k), faktory chvostování (T_f) a rozlišení (R_s) pro směs peptidů na koloně HILIC-A při použití isokratické a gradientové eluce.

Peptid	Isokratická eluce			Gradientová eluce		
	k	T_f	R_s	k	T_f	R_s
Leucin enkefalin amid	0,73	1,2	–	2,30	1,3	–
Leucin enkefalin	0,76	1,1	0,19	4,59	1,3	3,06
[Met⁵] enkefalin	0,81	1,2	0,24	5,16	1,1	0,80
[Arg⁸] vasotocin	9,19	1,8	21,37	24,46	1,0	35,21
[Lys⁸] vasopresin	9,70	2,3	0,85	24,93	1,0	0,88
Angiotensin II	32,40	3,5	16,36	28,37	2,4	3,77
Angiotensin I	59,21	2,6	7,56	29,79	2,0	1,25

5 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byly studovány a porovnávány tři stacionární fáze kolon HILIC-B (aminopropylová stacionární fáze), HILIC-N (silikagel modifikovaný polyhydroxylovým řetězcem) a HILIC-A (nemodifikovaný silikagel) z pohledu retenčního mechanismu. Současně byly tyto kolony testovány a porovnány při separaci vybraných biologicky aktivních peptidů.

Testováním vlivu poměru acetonitrilu a vodné složky mobilní fáze (v rozsahu 76–92 obj. % acetonitrilu) na retenci modelové sady peptidů bylo zjištěno, že se na retenčním mechanismu podílí jak rozdělování mezi vrstvu vodné fáze imobilizované na povrchu stacionární fáze a mobilní fázi, tak i adsorpce na povrchu stacionární fáze.

Dále byl testován vliv koncentrace pufru mobilní fáze na retenci vybrané sady analytů a peptidů. V případě kolony HILIC-B byl pozorován významný vliv změny koncentrace pufru mobilní fáze na retenci negativně nabitých kyselin, jejichž retence se snižováním koncentrace pufru výrazně zvyšovala. U kolony HILIC-N byl pozorován vždy stejný trend jako na koloně HILIC-B, avšak obecně byla retence kyselých látek nižší a bazických vyšší. Změna retence se změnou koncentrace pufru mobilní fáze byla pozorována i u bazických látek na koloně HILIC-A, jejichž retence se se snižováním koncentrace mírně zvyšovala. Retence nabitých peptidů byla taktéž ovlivněna změnou koncentrace pufru mobilní fáze. Na koloně HILIC-B se snižování koncentrace pufru projevovalo u pozitivně nabitých peptidů ([Lys⁸] vasopresin, [Arg⁸] vasotocin, leucin enkefalin amid a angiotensin I) snížením jejich retence díky elektrostatické repulzi a naopak u peptidů s částečně deprotonovanou hydroxylovou skupinou (leucin enkefalin a [Met⁵] enkefalin) se retence zvyšovala vlivem aniontově výměnných interakcí. Na koloně HILIC-N byl vždy pozorován stejný trend jako na koloně HILIC-B. Na koloně HILIC-A měla změna koncentrace pufru nejzásadnější vliv na retenci angiotensinu II, jehož retence se se snižováním koncentrace pufru zvyšovala.

Sledováním vlivu pH pufru vodné složky mobilní fáze na retenci modelové sady analytů bylo zjištěno, že vlivem kationtově výměnných interakcí kolona HILIC-A podstatně více zadržovala pozitivně nabitě analyty při pH pufru vyšším než 3,5 (v závislosti na hodnotách pK_a testovaných analytů). Negativně nabitě analyty nebyly kolonou téměř zadržovány. Naopak, na koloně HILIC-B byla nejvyšší retence pozorována u negativně nabitých analytů, díky dominantním aniontově výměnným

interakcím. Na koloně HILIC-N byl pozorován stejný trend jako na koloně HILIC-B, avšak pozitivně nabitě analyty vykazovaly retenci vyšší, a naopak negativně nabitě analyty vykazovaly retenci nižší. Také pH pufru vodné složky mobilní fáze mělo vliv na retenci peptidů. Předpokládáme, že při vyšším pH dochází k disociaci nezreagovaných zbytkových silanolových skupin u kolon HILIC-B a HILIC-N, a tím k vyšší retenci pozitivně nabitých peptidů.

Dále byla porovnána retentivita (retence cytosinu a BTMA) studovaných kolon s 21 komerčně dostupnými kolonami používanými v HILIC. Studované kolony vykazovaly v porovnání s ostatními kolonami nižší retenci, avšak u kolon HILIC-B a HILIC-A byly pozorovány nejsilnější dopady elektrostatických interakcí na retenci pozitivně nabitého BTMA.

V rámci této práce bylo též provedeno porovnání separace směsi peptidů za použití gradientové a isokratické eluce na jednotlivých kolonách. Pomocí gradientové eluce bylo dosaženo kratší doby analýzy na každé koloně. Dále byla získána lepší symetrie píků na kolonách HILIC-B a HILIC-A, na koloně HILIC-N se však symetrie peptidů zhoršila.

Závěrem můžeme konstatovat, že studované kolony jsou vhodné pro používání v HILIC módu. Bylo ukázáno, že koncentrace a pH pufru hrají zásadní roli v retenci polárních látek obsahujících ionizovatelné funkční skupiny. Optimalizací těchto parametrů můžeme efektivně ovlivňovat separaci jak malých polárních látek, tak i větších biologicky aktivních molekul, jako jsou například peptidy.

6 CITOVANÁ LITERATURA

- [1] D. T.-T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J.-L. Veuthey: Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. *Journal of Separation Science* **29**, 1836–1848 (2006).
- [2] P. Jandera, T. Hájek: Mobile phase effects on the retention on polar columns with special attention to the dual hydrophilic interaction – reversed-phase liquid chromatography mechanism, a review. *Journal of Separation Science* **41**, 145–162 (2017).
- [3] T. Yoshida: Peptide Separation in Normal Phase Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* **69**:15, 3038–3043 (1997).
- [4] P. Jandera: Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta* **692**, 1–25 (2011).
- [5] L. Nováková, M. Douša: Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. Praha, Europrint, (2013).
- [6] M. Taraji, P. R. Haddad, R. I. Amos, M. Talebi, R. Szucs, J. W. Dolan, C. A. Pohl: Chemometric-assisted method development in hydrophilic interaction liquid chromatography: A review. *Analytica Chimica Acta* **1000**, 20–40 (2018).
- [7] J. C. Linden, C. L. Lawhead: Liquid chromatography of saccharides. *Journal of Chromatography*, **105**, 125–133 (1975).
- [8] A. J. Alpert: Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic-acid and other polar compound. *Journal of Chromatography* **499**, 177–196 (1990).
- [9] M. Boumahraz, V. Y. Davydov, A. V. Kiselev: Separation of Carbohydrates by Liquid Chromatography on Silica Gel, Adding Adsorption Modifiers to the Eluent. *Chromatographia*, **15**:12, 751–756 (1982).
- [10] B. Buszewski, S. Noga: Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **402**:1, 231–247 (2012).
- [11] D. V. McCalley, U. D. Neue: Estimation of the extent of the water-rich layer associated with the silica surface in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1192**, 225–229 (2008).
- [12] P. Hemström, K. Irgum: Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of*

- Separation Science*, **29**, 1784–821 (2006).
- [13] D. V. McCalley: Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1217**, 3408–3417 (2010).
- [14] K. Kalíková, P. Kozlík, M. Gilar, E. Tesařová: Properties of two amide-based hydrophilic interaction liquid chromatography columns. *Journal of Separation Science*, **36**, 2421–2429 (2013).
- [15] Y. Guo, S. Gaiki: Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1074**, 71–80 (2005).
- [16] B. Chauve, D. Guillarme, P. Cléon, J.-L. Veuthey: Evaluation of various HILIC materials for the fast separation of polar compounds. *Journal of Separation Science*, **33**, 752–764 (2010).
- [17] B. Dejaegher, Y. V. Heyden: HILIC methods in pharmaceutical Analysis. *Journal of Separation Science*, **33**, 698–715 (2010).
- [18] R. Li, J. Huang: Chromatographic behavior of epirubicin and its analogues on high-purity silica in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1041**, 163–169 (2004).
- [19] B. A. Olsen: Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. *Journal of Chromatography A*, **913**, 113–122 (2001).
- [20] J. C. Valette, C. Demesmay, J. L. Rocca, E. Verdon: Separation of Tetracycline Antibiotics by Hydrophilic Interaction Chromatography Using an Amino-Propyl Stationary Phase, *Chromatographia*, **59**, 55–60 (2004).
- [21] T. Ikegami, K. Tomomatsu, H. Takubo, K. Horie, N. Tanaka: Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1184**, 474–503 (2008).
- [22] P. J. Boersema, S. Mohammed, A. J. R. Heck: Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **391**, 151–159 (2008).
- [23] R. I. Chirita, C. West, S. Zubrzycki, A. L. Finaru, C. Elfakir: Investigations on the

- chromatographic behaviour of zwitterionic stationary phases used in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1218**, 5939–5963 (2011).
- [24] A. Kumar, J. C. Heaton, D. V. McCalley: Practical investigation of the factors that affect the selectivity in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1276**, 33–46 (2013).
- [25] O. Kozlov, Z. Kadlecová, M. Gilar, T. Gondová, K. Kalíková, E. Tesařová: Systematic evaluation of selected supercritical fluid chromatography diol and diethylamine-based columns for application in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Separation Science plus*, 1–8 (2019).
- [26] D. V. McCalley: Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? *Journal of Chromatography A*, **1171**, 46–55 (2007).
- [27] D. V. McCalley: A study of the analysis of acidic solutes by hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1534**, 64–74 (2018).
- [28] P. Kozlík, V. Šimová, K. Kalíková, Z. Bosáková, D. W. Armstrong, E. Tesařová: Effect of silica gel modification with cyclofructans on properties of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases. *Journal of Chromatography A*, **1257**, 58–65 (2012).
- [29] H. A. Claessens, M. A. van Straten, C. A. Cramers, M. Jezierska, B. Buszewski: Comparative study of test methods for reversed-phase columns for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **826**, 135–156, (1998).
- [30] H. A. Claessens: Trends and progress in the characterization of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, **20**:10, 563–583 (2001).
- [31] L. Snyder, H. Poppe: Mechanism of solute retention in liquid-solid chromatography and the role of the mobile phase in affecting separation: Competition versus “sorption”. *Journal of Chromatography A*, **184**, 363–413 (1980).
- [32] P. J. Schoenmakers, H. A. Billiet, L. D. Galan: Systematic study of ternary solvent behaviour in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography*

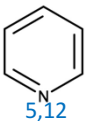
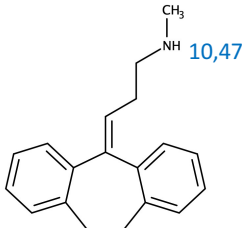
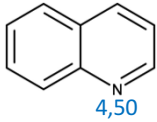
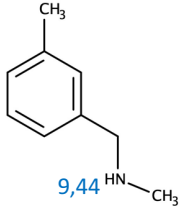
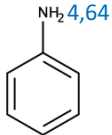
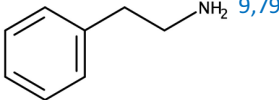
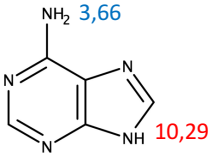
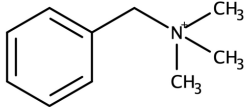
- A*, **218**, 261–284 (1981).
- [33] G. Jin, Z. Guo, F. Zhang, X. Xue, Y. Jin, X. Liang: Study on the retention equation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Talanta*, **76**:3, 522–527 (2008).
- [34] M. J. Badgett, B. Boyes, R. Orlando: Peptide retention prediction using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1537**, 58–65 (2018).
- [35] B.-Y. Zhu, C. T. Mant, R. S. Hodges: Hydrophilic-interaction chromatography of peptides on hydrophilic and strong cation-exchange columns. *Journal of Chromatography*, **548**, 13–24 (1991).
- [36] A. R. Oyler, B. L. Armstrong, J. Y. Cha, M. X. Zhou, Q. Yang, R. I. Robinson, R. Dunphy, D. J. Burinsky: Hydrophilic interaction chromatography on amino-silica phases complements reversed-phase high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for peptide Analysis. *Journal of Chromatography A*, **724**, 378–383 (1996).
- [37] M. Gilar, P. Olivova, A. E. Daly, J. C. Gebler: Orthogonality of Separation in Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, **77**:19, 6426–6434 (2005).
- [38] K. Medzihradsky: The Chemistry of the Opioid Receptor Binding Sites. *Journal of Peptide Science*, **9**, 333–353 (2003).
- [39] V. Šolínová, V. Kašička, T. Barth, L. Hauzerová, S. Fanali: Analysis and separation of enkephalin and dalargin analogues and fragments by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **1018**, 9–18 (2005).
- [40] I. Marcotte, F. Separovic, M. Auger, S. M. Gagné: A Multidimensional ¹H NMR Investigation of the Conformation of Methionine-Enkephalin in Fast-Tumbling Bicelles. *Biophysical Journal*, **86**, 1587–1600 (2004).
- [41] J. Hughes, T. W. Smith, H. W. Kosterlitz, L. A. Fothergill, B. A. Morgan, H. R. Morris: Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, **258**, 577–579 (1975).
- [42] K. Soukupová, E. Krafková, J. Suchánková, E. Tesařová: Comparison of zirconia- and silica-based reversed stationary phases for separation of enkephalins. *Journal of Chromatography A*, **1087**, 104–111 (2005).

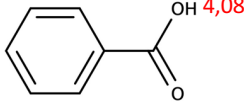
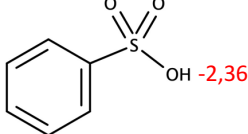
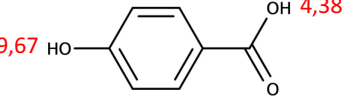
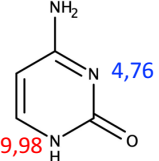
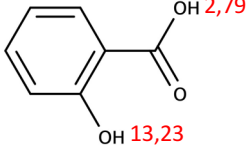
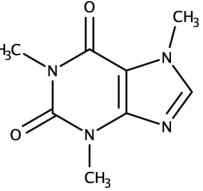
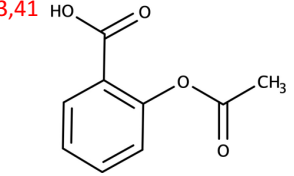
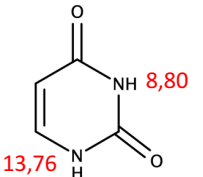
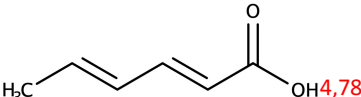
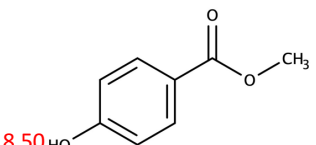
- [43] Y. Yang, R. I. Boysen, M. T. Hearn: Hydrophilic interaction chromatography coupled to electrospray mass spectrometry for the separation of peptides and protein digests. *Journal of Chromatography A*, **1216**, 5518–5524 (2009).
- [44] L. Janečková, J. Sobotníková, E. Tesařová, Z. Bosáková: Využití moderních reverzních stacionárních fází na bázi oxidu zirkoničitého pro analýzu bioaktivních peptidů. *Chemické Listy*, **104**, 334–342 (2010).
- [45] K.-Y. Han, E. Ban, Y. S. Yoo: Analysis of vasopressin using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detector based on competitive immunoassay. *Journal of Chromatography A*, **1013**, 215–220 (2003).
- [46] J. Dudkiewicz-Wilczynska, A. Snycerski, J. Tautt: HPLC method for the determination of Oxytocin in pharmaceutical dosage form and comparison with biological method. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **57**:6, 403–406 (2000).
- [47] E. T. Larson, D. M. O'Malley, R. H. Melloni Jr.: Aggression and vasotocin are associated with dominant–subordinate relationships in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, **167**, 94–102 (2006).
- [48] K. B. Brosnihan, M. C. Chappell: Measurement of Angiotensin Peptides: HPLC-RIA. *Methods in Molecular Biology*, **1527**, 81–99, 2017.
- [49] R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell: Harper's Illustrated Biochemistry, New York: McGraw-Hill Companies, (2003).
- [50] N. A. Lacher, K. E. Garrison, S. M. Lunte: Separation and detection of angiotensin peptides by Cu(II) complexation and capillary electrophoresis with UV and electrochemical detection. *Electrophoresis*, **23**, 1577–1584 (2002).
- [51] S. Magiera, A. Kolanowska, J. Baranowski: Salting-out assisted extraction method coupled with hydrophilic interaction liquid chromatography for determination of selected β -blockers and their metabolites in human urine. *Journal of Chromatography B*, **1022**, 93–101 (2016).
- [52] B. Tircova, P. Kozlík: HILIC-MS/MS Method for Analysis of Ephedrine in Internet-available Drugs. *Chromatographia*, **80**, 523–528 (2016).
- [53] A. N. Ramdzan, L. Barreiros, M. I. Almeida, S. D. Kolev, M. A. Segundo: Determination of salivary cotinine through solid phase extraction using a bead-injection lab-on-valve approach hyphenated to hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1429**, 284–291 (2016).

- [54] Q. Liu, L. Xu, Y. Ke, Y. Jin, F. Zhang, X. Liang: Analysis of cephalosporins by hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **54**, 623–628 (2011).
- [55] F. N. Ihunegbo, S. Tesfalidet, W. Jiang: Determination of melamine in milk powder using zwitterionic HILIC stationary phase with UV detection. *Journal of Separation Science*, **33**, 988–995 (2010).
- [56] Z. G. Shi, Y. B. Wu, Y. B. Luo, Y. Q. Feng: Analysis of Pterins in Urine by HILIC. *Chromatographia*, **71**, 761–768 (2010).
- [57] C. D. Iverson, X. Gu, C. A. Lucy: The Hydrophilicity vs. Ion Interaction Selectivity Plot Revisited: The Effect of Mobile Phase PH and Buffer Concentration on Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Selectivity Behavior. *Journal of Chromatography A*, **1458**, 82–89 (2016).

Příloha A

Strukturní vzorce, hodnoty pK_a a $\log P$ sady analytů získané pomocí programu MarvinSketch.

Název	$\log P$	Vzorec	Zdroj	Název	$\log P$	Vzorec	Zdroj
Pyridin	0,76	 5,12	[24]	Nortriptylin	4,43	 10,47	[24, 26]
Chinolin	2,13	 4,50	[14]	N- benzylmethyamin	2,05	 9,44	[14]
Anilin	1,14	 NH ₂ 4,64	[14]	2-fenylethylamin	1,39	 NH ₂ 9,79	[14]
Adenin	-0,57	 NH ₂ 3,66 10,29	[24, 25]	BTMA	-2,25	 CH ₃ CH ₃ CH ₃	[25]

Název	log P	Vzorec	Zdroj	Název	log P	Vzorec	Zdroj
Kyselina benzoová	1,67		[24]	Kyselina benzosulfonová	1,15		[25-27]
Kyselina 4-hydroxybenzoová	1,33		[24, 27]	Cytosin	-1,24		[15, 24, 25]
Kyselina salicylová	1,98		[15, 27]	Kofein	-0,55		[24, 26]
Kyselina acetylsalicylová	1,24		[15, 27]	Uracil	-0,86		[24, 25]
Kyselina sorbová	1,45		—	Methyl-4-hydroxybenzoát	1,64		—

Příloha B

Hodnoty kapacitních poměrů (k) polárních analytů při testování vlivu koncentrace pufru na charakterizovaných kolonách.

Analyt	HILIC-B			HILIC-N			HILIC-A		
	k			k			k		
	10 mM	30 mM	50 mM	10 mM	30 mM	50 mM	10 mM	30 mM	50 mM
Pyridin	0,13	0,12	0,13	0,14	0,14	0,14	0,22	0,22	0,23
Chinolin	0,07	0,05	0,06	0,06	0,06	0,05	0,10	0,10	0,09
Anilin	0,05	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03
Nortriptylin	*	*	*	*	0,07	0,12	0,92	0,69	0,60
N-benzylmethylamin	*	0,04	0,13	0,07	0,27	0,35	1,25	1,02	0,93
2-fenylethylamin	*	0,05	0,15	0,09	0,29	0,39	1,14	0,91	0,82
Kyselina benzoová	2,30	1,08	0,72	0,73	0,40	0,28	0,06	0,06	0,06
4-hydroxybenzoová kyselina	1,74	0,85	0,60	0,53	0,31	0,23	0,05	0,05	0,05
Kyselina salicylová	9,28	3,20	2,09	2,44	1,03	0,68	*	0,01	0,03
Methyl-4-hydroxybenzoát	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,02	0,02	0,01
Kyselina sorbová	1,12	0,54	0,38	0,38	0,22	0,16	0,05	0,06	0,05
Kyselina acetylsalicylová	5,66	2,41	1,59	1,36	0,71	0,51	0,09	0,11	0,11
Kyselina benzensulfonová	12,95	4,23	2,81	2,80	1,21	0,85	*	*	*
Kofein	0,16	0,14	0,14	0,16	0,16	0,16	0,21	0,21	0,20
Cytosin	1,13	1,04	1,06	1,29	1,33	1,33	0,70	0,70	0,70
Uracil	0,42	0,38	0,39	0,43	0,43	0,44	0,18	0,19	0,19
Adenin	0,62	0,57	0,57	0,75	0,76	0,76	0,56	0,56	0,55
BTMA	*	*	0,08	0,03	0,22	0,31	1,82	1,67	1,61

Mobilní fáze: ACN/mravenčan amonný pH = 3,5, 83:17 (v/v). (*) Eluce před markerem mrtvého času.

Příloha C

Hodnoty kapacitních poměrů (k) polárních analytů při testování vlivu pH pufru na charakterizovaných kolonách.

Analyt	HILIC-B			HILIC-N			HILIC-A		
	k			k			k		
	pH = 2,1	pH = 3,5	pH = 5,5	pH = 2,1	pH = 3,5	pH = 5,5	pH = 2,1	pH = 3,5	pH = 5,5
Pyridin	0,04	0,13	0,13	0,14	0,14	0,14	0,58	0,22	0,19
Chinolin	0,03	0,07	0,07	0,06	0,06	0,07	0,22	0,10	0,09
Anilin	0,03	0,05	0,04	0,05	0,04	0,04	0,09	0,04	0,04
Nortriptylin	*	*	*	*	*	0,06	0,69	0,92	3,00
N-benzylmethylamin	*	*	*	0,02	0,07	0,32	0,93	1,25	4,36
2-fenylethylamin	*	*	*	0,02	0,09	0,32	0,86	1,14	3,93
Kyselina benzoová	0,15	2,30	20,97	0,08	0,73	3,93	0,02	0,06	0,03
4-hydroxybenzoová kyselina	0,17	1,74	38,84	0,11	0,53	5,79	0,03	0,05	0,08
Kyselina salicylová	1,47	9,28	8,25	0,49	2,44	1,26	0,01	*	*
Methyl-4-hydroxybenzoát	0,05	0,05	0,07	0,04	0,04	0,04	0,02	0,02	0,02
Kyselina sorbová	0,10	1,12	18,07	0,07	0,38	3,72	0,02	0,05	0,13
Kyselina acetylsalicylová	0,26	5,66	19,21	0,11	1,36	3,49	0,02	0,09	*
Kyselina benzensulfonová	16,98	12,95	8,85	3,83	2,80	1,32	*	*	*
Kofein	0,15	0,16	0,15	0,17	0,16	0,17	0,21	0,21	0,21
Cytosin	0,33	1,13	1,11	0,60	1,29	1,35	0,98	0,70	0,69
Uracil	0,39	0,42	0,44	0,43	0,43	0,45	0,18	0,18	0,20
Adenin	0,44	0,62	0,72	0,66	0,75	0,81	0,68	0,56	0,57
BTMA	*	*	*	*	0,03	0,27	1,37	1,82	6,57

Mobilní fáze: ACN/10mM mravenčan amonný pH = 2,1 a pH = 3,5, 10mM octan amonný pH = 5,5, 83:17 (v/v). (*) Eluce před markerem mrtvého času.

Příloha D

Hodnoty kapacitních poměrů (k) peptidů při testování vlivu koncentrace pufru na charakterizovaných kolonách.

Peptid	HILIC-B			HILIC-N			HILIC-A		
	k			k			k		
	10 mM	30 mM	50 mM	10 mM	30 mM	50 mM	10 mM	30 mM	50 mM
[Lys ⁸] vasopresin	0,91	2,11	3,33	3,51	7,59	9,93	10,26	10,56	9,70
[Arg ⁸] vasotocin	0,77	1,90	3,00	3,11	6,77	8,91	10,03	10,06	9,19
Leucin enkefalin amid	0,05	0,20	0,31	0,21	0,37	0,60	0,99	0,82	0,73
Leucin enkefalin	2,86	2,41	2,12	1,79	1,76	1,44	0,84	0,80	0,76
[Met ⁵] enkefalin	3,78	2,88	2,64	2,43	2,28	1,85	0,89	0,86	0,81
Angiotensin II	37,15	33,94	35,03	37,22	47,56	41,09	43,30	39,33	32,40
Angiotensin I	14,09	17,98	22,50	24,63	44,02	44,17	-	-	59,21

Mobilní fáze: ACN/mravenčan amonný pH = 3,5, 83:17 (v/v). (-) Odezva pod mezí detekce.

Příloha E

Hodnoty kapacitních poměrů (*k*) peptidů při testování vlivu pH pufru na charakterizovaných kolonách.

Peptid	HILIC-B			HILIC-N			HILIC-A		
	<i>k</i>			<i>k</i>			<i>k</i>		
	pH = 2,1	pH = 3,5	pH = 5,5	pH = 2,1	pH = 3,5	pH = 5,5	pH = 2,1	pH = 3,5	pH = 5,5
[Lys ⁸] vasopresin	0,65	0,91	1,19	3,45	3,51	5,49	13,20	10,26	33,67
[Arg ⁸] vasotocin	0,37	0,77	1,01	2,85	3,11	4,70	12,18	10,03	21,80
Leucin enkefalin amid	-0,05	0,05	0,22	0,15	0,21	0,22	0,90	0,99	0,47
Leucin enkefalin	0,07	2,86	19,34	0,22	1,79	3,99	0,73	0,84	0,60
[Met ⁵] enkefalin	0,28	3,78	19,61	0,31	2,43	4,29	0,78	0,89	0,58
Angiotensin II	2,07	37,15	-	6,64	37,22	88,80	19,61	43,30	32,48
Angiotensin I	1,60	14,09	-	9,65	24,63	90,04	-	-	72,60

Mobilní fáze: ACN/10mM mravenčan amonný pH = 2,1 a pH = 3,5, 10mM octan amonný pH = 5,5, 83:17 (v/v). (-) Odezva pod mezí detekce.